This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representation of
The original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

THIS PAGE BLANK (USPTO)

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2001年11月1日 (01.11.2001)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 01/81927 A1

(51) 国際特許分類7: G01N 33/569

(21) 国際出願番号: PCT/JP01/03502

(22) 国際出願日: 2001年4月24日 (24.04.2001)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願2000-124070 2000年4月25日 (25.04.2000) JP

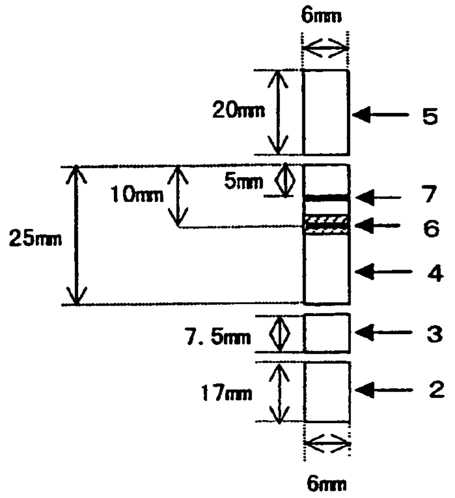
(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 株式会社トクヤマ (TOKUYAMA CORPORATION) [JP/JP]; 〒745-8648 山口県徳山市御影町1番1号 Yamaguchi (JP). 学校法人 日本大学 (NIHON UNIVERSITY SCHOOL JURIDICAL PERSON) [JP/JP]; 〒102-8275 東京都千代田区九段南四丁目8番24号 Tokyo (JP).

(72) 発明者; および
(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 平田広一郎 (HIRATA, Kouichirou) [JP/JP]; 〒305-0047 茨城県つくば市千現1-23-2 センチュリー時計台III-203 Ibaraki (JP). 宇梶文緒 (UKAJI, Fumio) [JP/JP]; 〒305-0035 茨城県つくば市松代3-25-3-103 Ibaraki (JP). 松重浩司 (MATSUSHIGE, Koji) [JP/JP]; 〒305-0051 茨城県つくば市花畑1-15-2-511 Ibaraki (JP). 羽生尚広 (HANYU, Naohiro) [JP/JP]; 〒305-0051 茨城県つくば市二の宮4-8-3-5-101 Ibaraki (JP). 福島和雄 (FUKUSHIMA, Kazuo) [JP/JP]; 〒270-0157 千葉県流山市平和台5-36-23 Chiba (JP).

[続葉有]

(54) Title: METHOD OF DETECTING STREPTOCOCCUS SOBRINUS AND ANTIBODY THEREFOR

(54) 発明の名称: ストレプトコッカス・ソブリヌスの検出方法及びそのための抗体



(57) Abstract: A method of immunologically assaying *Streptococcus sobrinus* which participates in tooth decay; and an antibody and a diagnosis kit to be used in this method. As the antibody, use is made of an antibody having an ability to bind to *S. sobrinus* at a strength 100 times or more higher than to *S. mutans*.

(57) 要約:

齲蝕に関与するストレプトコッカス・ソブリヌスの免疫学的な測定方法及び該方法に用いる抗体、診断キットが提供される。抗体として、ストレプトコッカス・ソブリヌスに対する結合能が、ストレプトコッカス・ミュータンスに対する結合能の１００倍以上である抗体が用いられる。

WO 01/81927 A1

(74) 代理人: 弁理士 小田島平吉, 外(ODAJIMA, Heikichi et al.); 〒107-0052 東京都港区赤坂1丁目9番15号 日本自転車会館 小田島特許事務所 Tokyo (JP).

(81) 指定国 (国内): JP, US.

(84) 指定国 (広域): ヨーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR).

添付公開書類:
— 国際調査報告

２文字コード及び他の略語については、定期発行される各*PCT*ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

明　細　書

ストレプトコッカス・ソブリヌスの検出方法及びそのための抗体

技術分野

本発明は、ストレプトコッカス・ソブリヌス（Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ ｓｏｂｒｉｎｕｓ）（以下、ＳｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓをＳ.と略記する場合あり）の免疫学的な測定方法、該測定による齲蝕の危険度の診断方法、並びにこれらの方法に使用できる抗体及び手段に関する。

背景技術

一般に、ミュータンスレンサ球菌（ｍｕｔａｎｓ ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｉ）と呼ばれる一群の乳酸発酵性細菌が、齲蝕発症に深く関わっていることが知られている。そして、人の口腔内におけるミュータンスレンサ球菌の存在量を調べることにより齲蝕危険度の判定を行なうことが行われておりそのための測定キットも市販されている。ミュータンスレンサ球菌の唾液中の濃度が10^5～10^6個／ｍｌの場合には、齲蝕の危険があり、10^6個／ｍｌ以上の場合は特に危険であると言われている。

これらミュータンスレンサ球菌群は、ストレプトコッカス・クリセタス（Ｓ. ｃｒｉｃｅｔｕｓ、血清型ａ）、ストレプトコッカス・ラッタス（Ｓ. ｒａｔｔｕｓ、血清型ｂ）、ストレプトコッカス・ミュータンス（Ｓ. ｍｕｔａｎｓ、血清型ｃ、ｅ、ｆ）、ストレプトコッカス・フェルス（Ｓ. ｆｅｒｕｓ、血清型ｃ）、ストレプトコッカス・マカカ（Ｓ. ｍａｃａｃａｅ、血清型ｃ）、ストレプトコッカス・ソブリヌス（Ｓ. ｓｏｂｒｉｎｕｓ、血清型ｄ、ｇ）、ストレプトコッカス・ドウネイ（Ｓ. ｄｏｗｎｅｙ、血清型ｈ）として、血清学的、遺伝学的に異なる７種の型に分類されている。

ところで、これらミュータンスレンサ球菌の中でヒトの口腔に存在するのは主にストレプトコッカス・ミュータンスとストレプトコッカス・ソブリヌスの２菌種であることが明らかとなったことからこれら２種の菌がヒトの齲蝕原性プラー

クを形成するミュータンスレンサ球菌として注目され、これら両菌の齲蝕に与える影響を比較する研究が行なわれるようになっている。その結果、(i)ストレプトコッカス・ミュータンスはヒト口腔から高頻度に分離されるのに対し、ストレプトコッカス・ソブリヌスは１～３割程度のヒト口腔から分離され、両菌種の口腔内での存在比率が大きく異なること（浜田茂幸．医学細菌学．４：２７１－３１４，１９８４．）、(ii)ストレプトコッカス・ミュータンスは歯面のくぼみや割れ目に齲蝕を生じるのに対しストレプトコッカス・ソブリヌスは歯面のくぼみや割れ目とともに平滑な面にも齲蝕を生じること（Ｍａｄｉｓｏｎ，Ｋ．Ｍ．Ｊ．Ｄｅｎｔ．Ｒｅｓ．７０：３８－４３，１９９１．、Ｈｉｒｏｓｅ，Ｈ．Ｃａｒｉｅｓ Ｒｅｓ．２７：２９２－２９７，１９９３．）、(iii)ストレプトコッカス・ソブリヌスはストレプトコッカス・ミュータンスと比較して歯表面への吸着能が高いこと（ｖａｎ ｄｅｒ Ｍｅｉ，ＨＣ．ｅｔ ａｌ．Ｃａｒｉｅｓ Ｒｅｓ．２５：４１５－４２３，１９９１．）、(iv)ストレプトコッカス・ソブリヌスの酸産生能はストレプトコッカス・ミュータンスよりも強いこと（ｄｅ Ｓｏｅｔ，Ｊ．Ｊ．，ｅｔ ａｌ．Ｃａｒｉｅｓ Ｒｅｓ．２５：１１６－１２２，１９９１．）等が明らかとなっている。

また、ストレプトコッカス・ミュータンスとストレプトコッカス・ソブリヌスの分布と齲蝕罹患の相関を調べた疫学研究の結果、ストレプトコッカス・ソブリヌスとストレプトコッカス・ミュータンスの両菌種を保有している人は、ストレプトコッカス・ミュータンスのみを保有している人よりも齲蝕罹患率が有意に高いことを示す報告もなされている（Ｏｋａｄａ，Ｔ．，ｅｔ ａｌ．Ｊ．Ｄｅｎｔ．Ｒｅｓ．７４：５０１，１９９５．、Ｋｏｈｌｅｒ，Ｂ．，ｅｔ ａｌ．Ｃｏｍｍｕｎｉｔｙ Ｄｅｎｔ．Ｏｒａｌ Ｅｐｉｄｅｍｉｏｌ．１５：３３２－３３５，１９８７．、Ｈｉｒｏｓｅ，Ｈ．，ｅｔ ａｌ．Ｃａｒｉｅｓ Ｒｅｓ．２７：２９２－２９７，１９９３．）。

上記のような報告例は、いずれもストレプトコッカス・ソブリヌスの齲蝕誘発能はストレプトコッカス・ミュータンスよりも強いことを示唆するものであり、このことから、齲蝕危険度の判定をより信頼性高く行なうためには、ミュータン

スレンサ球菌全体の濃度だけでなく、人の口腔内におけるストレプトコッカス・ソブリヌスの存否、及び多寡を知ることが重要と考えられる。しかしながら、従来の齲蝕危険度の診断はミュータンスレンサ球菌全体の濃度に基づくものであり、齲蝕危険性の指標として使用する目的でストレプトコッカス・ソブリヌスの濃度を測定した例は知られていない。

また、ストレプトコッカス・ソブリヌス自体を測定することに関しては、下記①〜⑤に示すようにストレプトコッカス・ソブリヌスに特異的に結合するモノクローナル抗体又はポリクローナル抗体を用いた免疫学的測定方法によりストレプトコッカス・ソブリヌスを測定した例が幾つか報告されているが、これら方法は培養、コロニー分離等の煩雑な操作を経て分離されたストレプトコッカス・ソブリヌスを測定する方法（下記①〜③）であるか、又はこのような培養操作を経ずに被検体液から直接測定する方法である場合には、高感度の測定を行なうために煩雑な操作を要する特殊な検出方法を採用しなければならない方法（下記④）であるか或いは高感度の測定ができない方法（下記⑤）であるかであり、齲蝕危険度を診断するための汎用的な測定方法として適しているとは言えない。

①バシトラシンを入れたミチス・サリバリウス培地（ＭＳＢ培地）を用いた培養により得られたコロニーについて、糖発酵試験等の生化学的方法、血清型特異的抗体を用いる免疫学的方法等によりコロニーを同定することでストレプトコッカス・ソブリヌスを個別に測定する方法（Ｏｋａｄａ，Ｔ．，ｅｔ ａｌ．Ｊ．Ｄｅｎｔ．Ｒｅｓ．７４：５０１，１９９５．、Ｋｏｈｌｅｒ，Ｂ．，ｅｔ ａｌ．Ｃｏｍｍｕｎｉｔｙ Ｄｅｎｔ．Ｏｒａｌ Ｅｐｉｄｅｍｉｏｌ．１５：３３２－３３５，１９８７．、Ｈｉｒｏｓｅ，Ｈ．，ｅｔ ａｌ．Ｃａｒｉｅｓ Ｒｅｓ．２７：２９２－２９７，１９９３．）。なお、該方法はストレプトコッカス・ソブリヌスと齲蝕との関係を調べる疫学研究において最も一般に採用される方法である。

②ストレプトコッカス・ソブリヌスに特異的なポリクローナル抗体を他のミュータンスレンサ球菌で吸収処理することによりストレプトコッカス・ソブリヌスに対する結合選択性を高めたポリクローナル抗体を用いる各種標準菌株（ｒｅｆ

ｅｒｅｎｃｅ　ｓｔｒａｉｎ）や臨床分離株（唾液や歯垢から培養法により分離された単一の菌）の測定方法（例えばＯｔａ，Ｆ．ｅｔ　ａｌ．，Ｚｂｌ．Ｂａｋｔ．Ｈｙｇ．Ａ２６５：３３０－３３９，１９８７．およびＢｒａｔｔｈａｌｌ，Ｄ．，Ｏｄｏｎｔ．Ｒｅｖｙ．２３：１８１－１９６，１９７２．）。なお、ポリクローナル抗体を他の菌で吸収処理することは、目的とする抗原に対する結合選択性（または反応性倍率とも称されている：目的とする抗原に対する結合能（ｂｉｎｄｉｎｇ　ａｂｉｌｉｔｙ）と他の抗原に対する結合能の割合）を高めるための手段であり、上記Ｏｔａ，Ｆ．ｅｔ　ａｌ．の方法では、ストレプトコッカス・ソブリヌス血清型ｄ及びｇ株に特異的なポリクローナル抗体をそれぞれ取得し、ストレプトコッカス・ミュータンスで吸収処理することによりストレプトコッカス・ミュータンスに対する結合能とストレプトコッカス・ソブリヌスに対する結合能の比が高められたポリクローナル抗体が得られている。しかし、いずれのポリクローナル抗体においても上記結合能の比は吸収処理に用いたストレプトコッカス・ミュータンス菌の結合能に対して約１８～２６倍、全ストレプトコッカス・ミュータンス菌の平均結合能に対して１５～１９倍程度である。また、前記Ｂｒａｔｔｈａｌｌの方法では、ポリクローナル抗体はストレプトコッカス・ソブリヌス血清型ｄの標準菌を動物に免疫して得られた抗体に、血清型ａの菌（即ちストレプトコッカス・クリセタス）による吸収処理を施しているが、ストレプトコッカス・ソブリヌスと他のミュータンスレンサ球菌に対する結合能については特に検討されていない。

③ストレプトコッカス・ソブリヌスのモノクローナル抗体を使用して唾液や歯垢中のストレプトコッカス・ソブリヌスについて一旦培養し菌体濃度を高くしてから測定する方法（ｄｅ　Ｓｏｅｔ，Ｊ．Ｊ．，Ｊ．Ｃｌｉｎ．Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ．２８：２４６７－２４７２，１９９０．）。なお、該文献には、上記モノクローナル抗体結合能が弱く蛍光抗体法により歯垢中のストレプトコッカス・ソブリヌスを直接検出できないことが記載されている。

④ポリクローナル抗体を使用した蛍光抗体法によりストレプトコッカス・ソブリヌスを測定する方法（Ｗａｌｔｅｒ，Ｊ．，Ｊ．Ｄｅｎｔ．Ｒｅｓ．５５：Ａ

８７－Ａ９３，１９７６．、Ｂａｂａａｈｍａｄｙ，Ｋ．Ｇ．，Ｃａｒｉｅｓ Ｒｅｓ．３２：５１－５８，１９９８．）。該方法は培養操作を必要としないものの、蛍光顕微鏡といった特別な装置を用い目視でストレプトコッカス・ミュータンスに結合したものとストレプトコッカス・ソブリヌスに結合したものとを蛍光の強弱で判別するという煩雑な手技を必要とするものである。

⑤ストレプトコッカス・ソブリヌスに対するポリクローナル抗体を利用したラテックス凝集法により唾液や歯垢から直接ストレプトコッカス・ソブリヌスを測定する方法（武井勉．阪大医学雑誌．３５：９３－１０９，１９９０．、Ｔａｋｅｉ，Ｔ．Ａｒｃｈｓ．ｏｒａｌ．Ｂｉｏｌ．３７：９９－１０４，１９９２．、特開平１－２５００６７．）。該方法における検出下限は1×10^{6}個／ｍｌ以上であり測定感度が不十分である。なお、一般に抗体として、動物に抗原として細菌を免疫することによって得られるポリクローナル抗体を用いて被検体液中の抗原細菌を測定する場合には、細菌の抗原性が一般に強いことから、その結合力は一般に高く、例えば10^{5}個／ｍｌ程度の細菌濃度を有する被検体液中の細菌を検出することは比較的容易であると考えられ、例えば該方法で採用しているのと同様なポリクローナル抗体を利用したラテックス凝集法においても10^{5}個／ｍｌの細菌を検出した例は多く知られていたにもかかわらずストレプトコッカス・ソブリヌスに関する上記方法では充分な感度が得られていない。これは、培養、コロニー分離等の操作により他の菌を除去していないため、用いたポリクローナル抗体が他のミュータンスレンサ球菌との交差反応を起こしてしまい、ラテックス凝集法に適用する抗体量を多くできなかった（使用する抗体量を増加すると、ストレプトコッカス・ミュータンスに対する反応が検出されてしまう）のが原因ではないかと考えられる。

齲蝕の危険度の存否を診断するための汎用的な測定方法としては、唾液又は歯垢から直接調製した臨床検体がそのまま使用でき、しかも簡便な操作で、例えば10^{5}個／ｍｌレベルの濃度のストレプトコッカス・ソブリヌスを検出することができる程度に高感度な測定が行なえることが重要と考えられるが、上述したようにこのような要求を満足するストレプトコッカス・ソブリヌスの測定方法は知

られていないのが現状である。

そこで、本発明は、口腔内から採取された唾液や歯垢から直接調製されたストレプトコッカス・ミュータンス及びストレプトコッカス・ソブリヌスを含み得る被検体液中のストレプトコッカス・ソブリヌスを、培養操作等の煩雑な操作を行なうことなく、迅速且つ簡便にしかも高感度で測定する方法を提供することを目的とする。

発明の開示

本発明者らは、検出感度があがらない原因の一つに被検体液中に存在する口腔内レンサ球菌等の夾雑物の影響があると考え、多種存在する口腔内レンサ球菌の中でも特にストレプトコッカス・ミュータンスに着目し、その影響について検討を行なった。具体的には、ストレプトコッカス・ソブリヌスに対する反応性とストレプトコッカス・ミュータンスに対する反応性との比が異なる抗体を作製し、該反応性の比と検出感度について種々検討を行なった。

この検討を通して、本発明者等によって始めて取得されたストレプトコッカス・ソブリヌスに対する結合能がストレプトコッカス・ミュータンスに対する結合能の１００倍以上である高感度な抗体を用いた場合には、被検体液中に存在するストレプトコッカス・ソブリヌスの濃度が１０^5個／ｍｌ程度でもストレプトコッカス・ソブリヌスを検出、定量することが可能であることを見出し、本発明を完成するに至った。

従って、本発明として、ストレプトコッカス・ソブリヌス及びストレプトコッカス・ミュータンスを含むことが疑われる被検体液中のストレプトコッカス・ソブリヌスの検出方法であって、

（A）　ストレプトコッカス・ソブリヌスに対する結合能がストレプトコッカス・ミュータンスに対する結合能の１００倍以上である抗体を用意すること、

（B）　該抗体を被検体液と接触させて免疫複合体を形成すること、並びに

（C）　該免疫複合体を測定すること、

を含んでなる方法、が提供される。

また、別の態様の本発明として、被験者における齲蝕の危険度の診断方法であっ

て、

（ａ）　被験者からの唾液及び／又は歯垢に由来する被検体液を調製すること、

（ｂ）　ストレプトコッカス・ソブリヌスに対する結合能がストレプトコッカス・ミュータンスに対する結合能の１００倍以上である抗体（Ｓ抗体）を用意すること、

（ｃ）　段階（ａ）で調製した被検体液と段階（ｂ）で用意した抗体とを接触させて免疫複合体を形成すること、並びに

（ｄ）　該免疫複合体を測定し、その多寡を齲蝕の危険度の存否の指標として評価すること、

を含んでなる診断方法、も提供される。

また、さらなる態様の本発明として、上記診断方法において、段階（ｃ）を該抗体（Ｓ抗体）の他にストレプトコッカス・ミュータンスに対して特異的に結合する抗体（M抗体）の共存下に実施するか、或いは段階（ｃ）に加え、Ｓ抗体をM抗体に代えて実施すること以外は段階（ｃ）と同様の操作を実施し、こうして形成されるM抗体に由来する免疫複合体も測定し、該複合体の多寡も齲蝕の危険度の存否の指標として評価する方法も提供される。

また、さらなる別の態様の本発明として、ストレプトコッカス・ソブリヌスに対する結合能がストレプトコッカス・ミュータンスに対する結合能の１００倍以上である抗体、さらに必要により、ストレプトコッカス・ミュータンスに対して特異的に結合する抗体、又はストレプトコッカス・ミュータンス及びストレプトコッカス・ソブリヌスに対して特異的に結合する抗体（ＭＳ抗体）を含んでなる免疫学的測定用キット又は被験者における齲蝕の危険度の診断用キット、も提供される。

また、さらなる別の態様の本発明として、被検体液を一時的に吸収しそして保持するためのサンプルパッド、標識抗体を一時的に保持するためのコンジュゲートパッド、並びに検出用抗体が固定化され、前記サンプルパッドに一時的に吸収しそして保持された被検体液および該被検体液に随伴して前記コンジュゲートパッドより流出した標識抗体が展開される展開メンブレンがこの順番で接合された免

疫クロマトストリップにおいて、前記検出用抗体としてストレプトコッカス・ソブリヌスに対する結合能がストレプトコッカス・ミュータンスに対する結合能の１００倍以上である抗体を用いることを特徴とする免疫クロマトストリップも提供される。

また、さらなる別の態様の本発明として、ストレプトコッカス・ソブリヌスに対する結合能がストレプトコッカス・ミュータンスに対する結合能の１００倍以上であるポリクローナル抗体も提供される。

上記本発明に従う方法によれば、後述する実施例で示されるように、免疫学的測定方法により唾液や歯垢中のストレプトコッカス・ソブリヌスを培養すること無しに直接測定することが可能となる。このような測定が可能となったのは、本発明者等によって高感度測定に要求される抗体の特性が明らかにされ、該特性を満足する新規な抗体が見出されたことによる。

本発明の方法においては、ストレプトコッカス・ミュータンスに対して特異的に結合する抗体を併用することにより、被検体液中のストレプトコッカス・ソブリヌス量とストレプトコッカス・ミュータンス量とを同時に測定することが可能となり、また、ストレプトコッカス・ミュータンス及びストレプトコッカス・ソブリヌスに対して特異的に結合する抗体を併用することにより、被検体液中のストレプトコッカス・ソブリヌス量とストレプトコッカス・ミュータンスとストレプトコッカス・ソブリヌスの総量とを同時に測定することが可能となる。

上記本発明のキット又はストリップにおいて、場合によって、ストレプトコッカス・ミュータンスに対して特異的に結合する抗体、又はストレプトコッカス・ミュータンス及びストレプトコッカス・ソブリヌスに対して特異的に結合する抗体を含めることができ、こうすることにより、これらのキット又はストリップはストレプトコッカス・ソブリヌス量と、ストレプトコッカス・ミュータンス量又はストレプトコッカス・ミュータンス及びストレプトコッカス・ソブリヌス総量とを同時に測定することが可能となる。

図面の簡単な説明

図１は、本発明の免疫クロマト法で使用するストリップの各部材の概略図を示

すものである。図中、２はサンプルパッドを、３はコンジュゲートパッドを、４は展開メンブレンを、５は吸収パッドを、６は検出ラインを、そして７は、コントロール判定ラインを表す。

図２は、上記図１に示すストリップの側面図である。

図３及び４は、本発明の免疫クロマト法で使用するＭ抗体又はＭＳ抗体を併用したストリップの各部材の概略図である。図中の数字は、図１のものに準ずる。

発明を実施するための最良の形態

本発明の方法では、ストレプトコッカス・ソブリヌス及びストレプトコッカス・ミュータンスを含むことが疑われる被検体液に含まれるストレプトコッカス・ソブリヌスが測定できる。かような被検体液は、天然及び人工のいかなるものであってもよいが、通常、唾液又は歯垢から、必要により、溶解又は希釈もしくは濃縮して調製された液状試料である。

ここで、ストレプトコッカス・ソブリヌスとは、ミュータンスレンサ球菌群の内で、菌体表層多糖抗原の構造により血清型がｄ型及びｇ型に分類される菌のいずれか又は両者を意味する。血清型がｄ型の標準菌株としては、Ｂ１３、ＯＭＺ１７６等の菌株が、血清型がｇ型の標準菌株としては、６７１５、ＯＭＺ６５等の菌株が例示される。

また、ストレプトコッカス・ミュータンスとは、ミュータンスレンサ球菌群の内で血清型がｃ、ｅ、及びｆ型に分類される菌を意味する。血清型がｃ型の標準菌株としてＩｎｇｂｒｉｔｔ、ＭＴ６Ｒ等の菌株が、血清型がｅ型の標準菌株としてＬＭ７、Ｐ４等の菌株が、血清型がｆ型の標準菌株としてＳＥ１１、ＯＭＺ１７５等の菌株がそれぞれ例示される。

本明細書に記載される標準菌株は、それぞれ一般的な標準菌株として従来より広く認識され、広範に且つ汎用的に使用されていることから（例えば、Ｏｎｏ，Ｔ．ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｍｅｄ．Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ．４１：２３１－２３５，１９９４．およびＰｅｒｃｈ，Ｂ．，Ａｃｔａ．ｐａｔｈ．ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ．ｓｃａｎｄ．８２：３５７－３７０，１９７４．およびＢｒａｔｔｈａｌｌ，Ｄ．，Ｏｄｏｎｔ．Ｒｅｖｙ．２１：１４３－１５２，１９７０．）、ストレプ

トコッカス・ミュータンスについては血清型ｃの標準菌株としてＩｎｇｂｒｉｔｔが、血清型ｅの標準菌株としてＰ４が、血清型ｆの標準菌株としてＯＭＺ１７５が、また、ストレプトコッカス・ソブリヌスについては血清型ｄの標準菌株としてＢ１３が、血清型ｇの標準菌株として６７１５が好適に使用できる。これらの標準菌株は、例えば、上記Ｏｔａ，Ｆ．ｅｔ　ａｌ.に記載されている公的機関等から比較的容易に入手できる。

本発明の検出方法によれば、ストレプトコッカス・ソブリヌス濃度が１０^{5}個／ｍｌ以上の被検体液についてストレプトコッカス・ソブリヌスの検出が可能である。なお、被検体液中のストレプトコッカス・ソブリヌス濃度（濃度の単位：個／ｍｌ）は、培養法等の従来公知の細菌学的手法に従い、ストレプトコッカス・ソブリヌスを計数することによって測定出来る。例えば、培養法により濃度測定をする場合には、被検体液を適宜希釈して得た懸濁液に超音波処理等の菌体の分散処理を施した後、ブレインハートインフュージョン（以下、「ＢＨＩ」と表記することもある）培地プレート上に塗布し生じるストレプトコッカス・ソブリヌスのコロニー数を計数し、被検体液の希釈倍率を乗じることにより、被検体液中のストレプトコッカス・ソブリヌス濃度（濃度の単位：個／ｍｌ）を測定することが出来る。但し、このとき、被検体液中に、ストレプトコッカス・ソブリヌス以外にもストレプトコッカス・ミュータンス、或いは他の口腔内細菌が含まれる場合には、培地プレート上に生じたコロニーはストレプトコッカス・ソブリヌスのコロニーとストレプトコッカス・ソブリヌス以外のコロニーに精確に分類され、ストレプトコッカス・ソブリヌスだけを正確に計数する必要がある。コロニーの分類は、培地プレート上に生じたコロニーについて、糖発酵試験等の生化学的手法、特異的抗体を利用した免疫学的手法、ＤＮＡプローブを利用した遺伝学的手法により行なうことができる。

本発明の方法で使用する被検体液中のストレプトコッカス・ミュータンス濃度は特に限定されないが、ストレプトコッカス・ソブリヌスの検出感度の観点から０～１０^{8}個／ｍｌ、特に１０^{5}～１０^{7}個／ｍｌであるのが好適である。該濃度は、ストレプトコッカス・ソブリヌスの濃度と同様にして測定することができる。

本発明の方法で使用する被検体液は、特に、齲蝕の危険度を診断するための対象としては、唾液又は歯垢を含む被検体液が特に好適に使用される。また、被検体液の調製が容易であるという観点から、培養操作を行なわずに唾液又は歯垢から直接調製した被検体液が特に好適に使用できる。なお、唾液及び歯垢は、被検体液中にそれぞれ単独で含まれていてもよいし、混合物として含まれていてもよい。

例えば歯垢のみを含む被検体液は、口腔内をうがい等により洗浄し唾液成分を除去した後に採取した歯垢を用いて調製すればよい。歯垢の採取は、口腔内の特定部位の歯垢をつまようじ、綿棒、スパチュラ等の従来公知の方法で採取することも出来るし、口腔内より無作為に採取することも出来る。このように採取された歯垢を液体に懸濁し被検体液とすればよい。該液体としては、水性液体であれば特に限定されず、例えば精製水、生理食塩水、又は従来公知の各緩衝液が使用可能であるが、抗原抗体反応を一定の条件下で最適に行うために緩衝液を使用することが特に好ましい。緩衝液としては、ｐＨ６．０からｐＨ８．０に緩衝能を有する従来公知の緩衝液が何ら制限無く使用可能であり、例えばリン酸緩衝液、トリス緩衝液、ＨＥＰＥＳ等のグッドの緩衝液類、或いはホウ酸緩衝液等が使用可能である。また、液体の量としては、歯垢１ｍｇに対して０．１～１０ｍｌの液体を用いれば歯垢を均一に懸濁することが出来るが、一般に「齲蝕の危険性あり」と診断される場合の歯垢中及び唾液中のストレプトコッカス・ソブリヌス濃度はそれぞれ１０^{5}（個／ｍｇ湿歯垢）及び１０^{5}（個／ｍｌ唾液）であることから、齲蝕危険度の診断を行なう場合には唾液をそのまま被検体液として用いた時との対応を考慮すると、歯垢１ｍｇに対して１ｍｌの液体を用いるのが最も好適である。歯垢を含む被検体液はそのままでも使用可能であるが、歯垢を分散させる目的で超音波処理を施す、ガラスビーズ等の破砕剤と混合し撹拌する等の、従来公知の処理を行ったものを被検体液とすることが好適である。

また、唾液のみを含む被検体液は、スポイト、ピペット等の従来公知の方法で採取された唾液を用いて調製することが出来る。採取された唾液は、そのまま或

いは、上記水性液体で適宜希釈して被検体液とすればよい。測定感度の点からは採取した唾液をそのまま被検体液とするのが好適である。

齲蝕の危険を有する人から採取した歯垢または唾液中には、通常、$１０^{５}$〜$１０^{７}$（個／ｍｇ湿歯垢）または$１０^{５}$〜$１０^{７}$（個／ｍｌ唾液）のストレプトコッカス・ソブリヌスが含まれている。

本発明の方法では、上記のような被検体液中のストレプトコッカス・ソブリヌスを、ストレプトコッカス・ソブリヌスに対する結合能とストレプトコッカス・ミュータンスに対する結合能の比率（ストレプトコッカス・ソブリヌスに対する結合能をストレプトコッカス・ミュータンスに対する結合能で除した値。以下、「S／M結合選択性」ともいう。）が１００以上であり、且つストレプトコッカス・ソブリヌスとの免疫複合体が通常の免疫学的測定を行う上で充分な安定性を保持できる結合能を有する抗体を用いて免疫学的測定方法により測定する。

ここで、抗体とは、抗体のグロブリンクラスは限定されず、現在知られているどのようなグロブリンクラスのものも含まれる。また、通常の抗体分子のみならず、該抗体の部分分解物（Ｆａｂ、Ｆａｂ’、Ｆａｂ’２等）、及び該抗体の活性フラグメント（抗体の抗原認識部位）が存在する部分構造等も含まれる。

また、抗体のS／M結合選択性が１００以上であるとは、酵素免疫測定法（以下、「ＥＬＩＳＡ法」と略すこともある）、放射免疫測定法等の従来公知の定量性の高い免疫学的測定方法により、ストレプトコッカス・ソブリヌスとストレプトコッカス・ミュータンスを抗原とし、抗原抗体反応の検出を行った際に、ストレプトコッカス・ソブリヌスを抗原として使用した場合に検出される結合能が、ストレプトコッカス・ミュータンスを抗原として使用した場合に検出される結合能の１００倍以上あることを指す。結合能の指標は、上記免疫学的測定法により抗原抗体反応により形成される免疫複合体の検出を行った際の測定値（または反応値ともいう）を用いてもよいし、抗原抗体反応に関与する抗原量すなわち菌体量を用いてもよい。

抗体のS／M結合選択性は、同一菌体量のストレプトコッカス・ソブリヌス及びストレプトコッカス・ミュータンスを抗原とし、抗原抗体反応を行った場合に、

ストレプトコッカス・ソブリヌスを抗原として使用した場合に検出される反応値をストレプトコッカス・ミュータンスを抗原として使用した場合に検出される反応値で除することにより求めることが出来る。例えば、放射免疫測定法により各１０^{7}個／ｍｌのストレプトコッカス・ソブリヌスとストレプトコッカス・ミュータンスを抗原とし、免疫複合体の検出を行った際に、ストレプトコッカス・ソブリヌスを抗原として使用した場合に検出される反応値が１００であり、ストレプトコッカス・ミュータンスを抗原として使用した場合に検出される反応値が1である場合、Ｓ／Ｍ結合選択性は１００である。

或いは、ストレプトコッカス・ソブリヌス及びストレプトコッカス・ミュータンスを抗原として使用した場合に、同一の反応値が検出される抗原量（菌体量）を比較して求めることも可能である。例えば、ＥＬＩＳＡ法によりストレプトコッカス・ソブリヌスとストレプトコッカス・ミュータンスを抗原とし、免疫複合体の検出を行った際に、１０^{6}個／ｍｌのストレプトコッカス・ソブリヌスを抗原として使用した場合に検出される測定値が1．０であり、１０^{8}個／ｍｌのストレプトコッカス・ミュータンスを抗原として使用した場合に検出される測定値が０．９である場合、Ｓ／Ｍ結合選択性は１００以上である。

抗体の各菌体に対する結合能（または反応性ともいう）は、標準菌株のリン酸生理食塩緩衝液（ｐＨ７．４）（以下、「ＰＢＳ」と略すこともある）懸濁液を被検体液として使用するＥＬＩＳＡ法により好適に測定することができる。このとき標準菌株としては、ストレプトコッカス・ソブリヌスの血清型ｄ及びｇの菌として、それぞれ例えばＢ１３及び６７１５が、また、ストレプトコッカス・ミュータンスの血清型ｃ、ｅ、及びｆの菌として、それぞれ例えばＩｎｇｂｒｉｔｔ、Ｐ４、及びＯＭＺ１７５が使用可能である。具体的手順としては、まず、特定濃度の標準菌株のＰＢＳ懸濁液を９６穴イムノプレートの各ウェルに添加し吸着した後、ブロッキングを行い、次いで、イムノプレートにストレプトコッカス・ソブリヌスに対する抗体を添加後、例えば酵素標識した二次抗体を添加し、酵素活性を測定することにより抗体の各菌体に対する結合能を評価することが出来る。

また、競合ＥＬＩＳＡ法を用いて結合能を評価する場合には、それぞれ同一濃

度のストレプトコッカス・ソブリヌス標準菌株のＰＢＳ溶液を９６穴イムノプレートの各ウェルに添加し吸着した後、ブロッキングを行い、次いで、イムノプレートにストレプトコッカス・ソブリヌスに対する抗体と、それぞれ一定量のストレプトコッカス・ソブリヌス或いはストレプトコッカス・ミュータンスの標準菌株を混合して添加後、例えば酵素標識した二次抗体溶液を添加し、酵素活性を測定することで、抗体の反応性を評価することが出来る。

Ｓ／Ｍ結合選択性が１００未満の抗体を用いた場合には、高感度な測定ができない。例えばＳ／Ｍ結合選択性が１０の抗体を用いた場合に、10^7個／ｍｌのストレプトコッカス・ソブリヌスを抗原として免疫複合体の検出を行った際の測定値を１００とすると、10^6個／ｍｌのストレプトコッカス・ソブリヌスを抗原として検出される測定値は１０であるが、10^7個／ｍｌのストレプトコッカス・ミュータンスを抗原として検出される測定値も１０である。すなわち、ストレプトコッカスソブリヌスの存在量が０であっても10^7個／ｍｌのストレプトコッカス・ミュータンスが存在する場合にはストレプトコッカス・ソブリヌスが10^6個／ｍｌあると判定してしまうことになる。

一般に、ストレプトコッカス・ソブリヌスの唾液中の濃度が10^5個／ｍｌ以上の場合には「齲蝕の危険あり」と判断できることから、ストレプトコッカス・ソブリヌス濃度が10^5個／ｍｌ以上を「齲蝕危険度陽性」と定義すると、上記のようなＳ／Ｍ結合選択性が１００未満の抗体を用いた場合には、その測定結果により偽陽性と判断される被検体数が多くなりすぎ、齲蝕危険度の診断を目的とした測定には適用できない。口腔内に存在し得るストレプトコッカス・ミュータンスを勘案し、相当する免疫複合体の測定結果を齲蝕危険度の指標としたときに偽陽性の発生率が小さいという観点から、Ｓ抗体のＳ／Ｍ結合選択性は５００以上、特に１０００以上であるのが好適である。

本発明で使用するＳ抗体は、そのＳ／Ｍ反応性倍率が１００以上であるものであれば特に限定されないが、抗体取得の容易さの観点からポリクローナル抗体であるのが好適である。

また、Ｓ抗体は、被検体液中のストレプトコッカス・ソブリヌスの全量を検出、

定量するためには、ストレプトコッカス・ソブリヌスの血清型ｄ及びｇ株に対する結合能が同等であることが好ましい。ここで、ストレプトコッカス・ソブリヌスの血清型ｄ及びｇ株との結合能が相互に同等であるとは、従来公知の免疫学的測定方法により、同一菌体量の血清型ｄ及びｇ株のストレプトコッカス・ソブリヌスを抗原とし、抗原抗体反応の検出を行った際に、両者から検出される結合能比が相互に２倍以内、好ましくは１．５倍以内であることを指す。

さらに、Ｓ抗体は、ストレプトコッカス・ソブリヌスとの免疫複合体が通常の免疫学的測定を行う上で充分な安定性を保持できる結合能を有する必要がある。ここで、「ストレプトコッカス・ソブリヌスとの免疫複合体が通常の免疫学的測定を行う上で充分な安定性を保持できる結合能」とは、一般的な免疫学的測定法の中のある特定の免疫学的測定法によりストレプトコッカス・ソブリヌスを測定する場合に、その測定方法においての類似した抗原（この場合、例えばストレプトコッカス・ミュータンスや他のレンサ球菌）について通常検出可能であると言われている菌体濃度のストレプトコッカス・ソブリヌスを検出することが可能となるような抗体の結合能のことを意味する。例えば、金コロイドを標識物質として用いた免疫クロマト法によりストレプトコッカス・ソブリヌスを測定する場合において、１０^{5}個／ｍｌ以上の濃度のストレプトコッカス・ソブリヌスを検出可能とする抗体の結合能を意味する。

このような、結合能は、ストレプトコッカス・ソブリヌスの標準菌体を用いた直接ＥＬＩＳＡ法における検出下限の菌体濃度として表すこともでき、ストレプトコッカス・ソブリヌスの標準菌体の懸濁液５０μｌを試料とし、９６穴イムノプレートの各ウェルに菌体を固定化後、５０ｎｇ／ウェルの抗体を用いて直接ＥＬＩＳＡ法により測定を行なったときの検出下限の菌体濃度が１０^{6}個／ｍｌ以上（５×１０^{4}個／ウェル）、特に２×１０^{5}個／ｍｌ以上（１０^{4}個／ウェル）、である時には、ストレプトコッカス・ソブリヌスとの免疫複合体が通常の免疫学的測定を行う上で充分な安定性を保持できる結合能を有すると言える。

なお、上記直接ＥＬＩＳＡ法における検出下限の菌体濃度とは、具体的には次のようにして決定される。

即ち、ＢＨＩ液体培地中で６７１５（ストレプトコッカス・ソブリヌス、血清型ｇ）及びＢ１３（ストレプトコッカス・ソブリヌス、血清型ｄ）を３７℃、嫌気条件下で培養した後、培養液を遠心処理し上清の培地成分を除去し菌体沈殿を回収し、次いで、菌体沈殿をＰＢＳにて洗浄後、ＰＢＳに再懸濁し、４０ｗで２０秒超音波処理を施した後、ＰＢＳにてA_{600}＝１．０に調整し、約１×１０^{9}個／ｍｌの菌体濃度の標準菌体懸濁液を得る。なお、この標準菌体懸濁液の菌体濃度は、適宜希釈した後にＢＨＩ培地プレート上に添加し、生じたコロニー数を計数し、希釈倍率を乗じて求めた値である。次いで、このようにして得た標準菌体懸濁液（A_{600}＝１．０）を、０．１Ｍ炭酸緩衝液（ｐＨ９．０）にて１〜１×１０^{5}倍に希釈して１０倍希釈系列を調製し、９６穴イムノプレートの各ウェルに５０μｌずつ添加し、４℃、１２時間放置し固定する。次いで、イムノプレートから菌体懸濁液を除去し、ＰＢＳにて各ウェルを洗浄後、ブロッキングを行った後、評価する抗体（一次抗体）のＩｇＧ濃度が１．０μｇ／ｍｌとなるように１％のＢＳＡ及び０．０５％のＴｗｅｅｎ２０を含むＰＢＳ（ｐＨ７．４）を用いて希釈してからイムノプレートの各ウェルに５０μｌづつ添加し、３７℃、１時間放置した後、イムノプレートから溶液を除去し洗浄する。その後、アルカリホスファターゼで標識した二次抗体｛例えば一次抗体がウサギＩｇＧの場合は、カッペル社製アルカリホスファターゼ標識抗ウサギＩｇＧポリクローナル抗体（カタログ番号：５９６５２）｝を、１％のＢＳＡ及び０．０５％のＴｗｅｅｎ２０を含むＰＢＳ（ｐＨ７．４）にて１０μｇ／ｍｌとなるように希釈したものをイムノプレートの各ウェルに５０μｌ添加し、３７℃、１時間放置した後、イムノプレートから溶液を除去し洗浄する。そして最後に、発色基質溶液であるｐ－ニトロフェニルリン酸の２－エタノールアミン水溶液｛例えばＢＩＯＲＡＤ社製発色基質溶液（カタログ番号：１７２－１０６３）｝を各ウェルに５０μｌずつ添加し、２５℃、２０分反応させた後に、０．４ＭのＮａＯＨを各ウェルに５０μｌずつ添加し反応を停止し、各ウェルの４０５ｎｍの吸光度及びバックグラウンドの吸光度を測定し、バックグランドと同等の吸光度を示すウェルに固定された菌体濃度を検出下限の菌体濃度とすることにより求めることができる。

本発明において、S抗体としては、S／M反応性倍率が１０００以上であり、ストレプトコッカス・ソブリヌスの血清型ｄ及びｇ株に対する結合能比が相互に２倍以内、特に１．５倍以内であり、上記検出下限の菌体濃度で表したストレプトコッカス・ソブリヌスに対する反応性が10^6個／ｍｌ以上、特に2×10^5個／ｍｌ以上であるモノクローナル抗体又はポリクローナル抗体を用いるのが特に好適であり、抗体取得の容易性を勘案すれば、この様な特性を有するポリクローナル抗体を用いるのが最も好適である。

S抗体は、該抗体がポリクローナル抗体である場合には、免疫動物にストレプトコッカス・ソブリヌスの全菌体または該全菌体より得られる抗原抽出物を免疫してストレプトコッカス・ソブリヌスに対するポリクローナル抗体を得、次いで得られた該ポリクローナル抗体からストレプトコッカス・ミュータンスとの交差反応性を有するポリクローナル抗体を除去することにより好適に得る事ができる。

また、S抗体がモノクローナル抗体である場合には、上記のような抗原で免疫した哺乳動物の脾細胞やリンパ細胞等の抗体産生細胞を分取し、分取した抗体産生細胞とミエローマ細胞を融合して得たハイブリドーマについてS／M反応性倍率が１００以上の抗体を産生するハイブリドーマを選択し、選択されたハイブリドーマの培養上清として製造する方法、或いは該ハイブリドーマを動物の腹腔内に移植して増殖させて腹水を回収することにより得ることができる。なお、ここで、該ハイブリドーマの抗体遺伝子の全部または一部を導入した組換え体を培養して調製された組換え抗体もモノクローナル抗体に含まれる。

以下、これら抗体の中でも取得が容易なポリクローナル抗体からなるS抗体の取得方法について詳細に説明する。

ポリクローナル抗体からなるS抗体を取得する場合の免疫用の抗原としては、ストレプトコッカス・ソブリヌスの血清型ｄ株、或いは血清型ｇ株の全菌体、これら全菌体からの抽出抗原、又はこれらの混合物等が使用出来る。

全菌体としては生菌の他、ホルマリン処理、或いは加熱処理等された死菌、凍結保存された菌体が使用可能である。

全菌体からの抗原の抽出は、抗原が多糖抗原である場合は、菌体懸濁液を加熱

処理する方法（Ｒａｎｔｓ，Ｌ．Ａ．，Ｓｔａｎｆｏｒｄ．Ｍｅｄ．Ｂｕｌｌ．１３：２９０－２９１，１９５５．）、亜硝酸により抽出する方法（武井勉．阪大医学雑誌．３５：９３－１０９，１９９０．）等の従来公知の方法により行なうことができる。抽出された多糖抗原は、そのままで抗原として使用することも可能であるし、更に精製して使用することも出来る。また、抗原がタンパク抗原である場合には、アルカリ、塩、キレート剤、カオトロピックイオン、界面活性剤を使用して抽出する（武井勉．阪大医学雑誌．３５：９３－１０９，１９９０．）、或いは菌体由来のタンパク質中に存在するする特定のタンパク質を精製する（Ｏｋａｈａｓｉ，Ｎ．Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．３０：３５－４７，１９８６．、Ｈａｍａｄａ，Ｓ．Ｊ．Ｇｅｎ．Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ．１３５：３３５－３４４，１９８９．）ことにより得ることができる。また、菌体の特定のタンパク質をコードする遺伝子の全部または一部を導入した組換え体を培養して調製された組換えタンパク質、特定のタンパク質のアミノ酸配列を基に合成された合成ペプチド等も抗原として使用できる。

これらの抗原抽出物等は、抗原としてそのまま使用することも可能であるし、免疫用担体と結合させて使用することも可能である。担体としては、スカシガイのヘモシアニン（ＫＬＨ）、ウシ血清アルブミン（ＢＳＡ）、ヒト血清アルブミン（ＨＳＡ）、ニワトリ血清アルブミン、ポリ－Ｌ－リジン、ポリアラニルリジン、ジパルミチルリジン、破傷風トキソイド又は多糖類等の従来公知の担体が好適に使用可能である。

本発明で使用するポリクローナル抗体からなるＳ抗体を作製するために用いる抗原としては、操作性の簡便さから、菌体を直接、或いは多糖抗原の抽出物をそのまま使用するのが好適であり、更に、得られる抗体の力価が高いことから、ストレプトコッカス・ソブリヌスの全菌体を直接免疫するのが特に好適である。

上記のような抗原を免疫する動物としては、抗体取得のために一般的に使用される動物が使用可能であるが、マウス、ヤギ、ウサギ、モルモット等の哺乳動物を用いるのが好適である。これら動物に抗原を免疫する方法としては、従来公知の方法が制限なく採用でき、菌体または菌体抽出物を直接免疫してもよいし、ア

ジュバントを添加混合して免疫してもよい。例えば、菌体を直接免疫する場合には、ストレプトコッカス・ソブリヌスをＢＨＩ液体培地等で培養後に得られる菌体の懸濁液をそのまま使用することも可能である。また、アジュバントとしては、フロイントの完全アジュバント、フロイントの不完全アジュバント、水酸化アルミニウムアジュバント又は百日咳菌アジュバント等の従来公知のアジュバントが好適に使用可能である。

これら動物に抗原を免疫後、採血し血清を調製することで、ストレプトコッカス・ソブリヌスに対するポリクローナル抗体を含む液体（以下、該液体を「抗血清」と表記する場合もある。）が得られる。

得られた抗血清は該抗血清中に含まれるポリクローナル抗体のＳ／M結合選択性が１００以上であればそのままでも免疫学的測定方法に使用可能であるが、通常抗血清中にはストレプトコッカス・ソブリヌスに特異的な抗体以外に他の抗体、及びアルブミン等の抗体以外のタンパク質が含まれているため、高感度且つ特異的な測定を行なうためには、得られた抗血清を塩析法、ゲル濾過法、イオン交換クロマトグラフィー法、アフィニティークロマトグラフィー法、電気泳動法等の方法により処理することでポリクローナル抗体画分を分取することが好ましい。例えば抗原としてストレプトコッカス・ソブリヌスの菌体をウサギに免疫すると、約４週間後以降に抗血清が得られ、例えばプロテインＡを用いたアフィニティークロマトグラフィー法によりポリクローナル抗体画分（ＩｇＧ画分）が得られる。

この様にして得られたポリクローナル抗体についてＳ／M結合選択性を決定し、その値が１００以上であれば、そのままＳ抗体として本発明の方法に使用できる。また、Ｓ／M結合選択性が１００未満である場合には、得られたポリクローナル抗体（以下、「原料抗体」ともいう。）からストレプトコッカス・ミュータンスとの交差反応性を有するポリクローナル抗体（以下、「交差反応性抗体」ともいう。）を除去すればよい。

一般に、ポリクローナル抗体は多種の抗体の混合物であり、前記のようにして取得したポリクローナル抗体の中には、ストレプトコッカス・ミュータンスにも反応する抗体が同時に存在し、そのため全体としてのＳ／M結合選択性が低下し

ていると考えられる。したがって、全体としてのＳ／Ｍ結合選択性が１００以上となるまで原料抗体から交差反応性抗体を選択的に分離除去すればよい。

但し、交差反応性抗体の中には、ストレプトコッカス・ミュータンスに対する親和定数の高いものから低いものまで様々な結合力を有す抗体が含まれており、原料抗体のＳ／Ｍ結合選択性を１００以上とするためにはストレプトコッカス・ミュータンスに対する親和定数の高い抗体のみならず親和定数の低い抗体も除去することが必要である。本発明者らは、ストレプトコッカス・ミュータンス菌体をそのまま用いて交差反応性抗体を除去する方法において、１ｍｇの原料抗体に対し４０（OD_{600}）以上という高い割合でストレプトコッカス・ミュータンス菌体を添加して吸収処理を行なうことによりＳ／Ｍ結合選択性を１００以上とすることに成功したものである。本発明者等の検討によれば、同様の方法でＳ／Ｍ結合選択性が５０及び９０程度の抗体を得ようとする場合には、それぞれ１ｍｇの原料抗体に対し約１（OD_{600}）及び約４（OD_{600}）の菌体を添加すればよいことが分かっており、Ｓ／Ｍ結合選択性が１００以上の抗体を得るためには、原料抗体に対して通常必要とされる菌体よりも著しく多量の菌体を使用しなければならないことが分かる。

原料抗体から交差反応性抗体を除去する方法は、特に限定されないが、アフィニティー精製法を採用するのが好適である。アフィニティー精製法により交差反応性抗体を分離する場合には、不溶性担体に固定化されたストレプトコッカス・ミュータンスの菌体または菌体由来の菌体表面抗原と、原料抗体とを接触させ、該不溶性担体（「Ｍ抗原固定化担体」ともいう。）に交差反応性抗体を吸着させて該不溶性担体と共に分離すればよい。あるいは、ストレプトコッカス・ミュータンスの菌体を、不溶性担体を使用せずそのまま使用し原料抗体と接触させ、菌体に交差反応性抗体を吸着させて該菌体と共に分離することもできる。これらの方法により、ストレプトコッカス・ミュータンスに対する結合能が低い或いは結合能を有さない抗体は、Ｍ抗原固定化担体あるいはストレプトコッカス・ミュータンスの菌体に吸着されないので、該担体あるいは該菌体と接触後、これと分離された抗体のＳ／Ｍ結合選択性は高くなる。

不溶性担体を使用する場合の、不溶性担体としては、アガロース、デキストラン、セルロース、ポリアクリルアミド、ポリスチレン、塩化ビニル、ガラス、シリコーンラバー、又は多孔性シリカビーズ等の従来公知の担体が何ら制限無く使用可能である。また、これら担体にストレプトコッカス・ミュータンスの菌体あるいは菌体由来の菌体表面抗原を固定化する方法としては、臭化シアン活性化法等の化学的結合法や、物理化学的吸着性を利用した方法が何ら制限無く使用可能である。

ストレプトコッカス・ミュータンスの菌体をそのまま使用する方法は、操作が簡便であり、またストレプトコッカス・ミュータンスの菌体表面に存在する複数種の抗原と反応する複数種の抗体を同時に除去することが可能であるということから、より好適である。この時、使用する菌体は、例えばストレプトコッカス・ミュータンスの標準菌株をＢＨＩ液体培地で培養することにより容易に調製できる。菌体としては生菌をそのまま使用することも出来るし、加熱処理、ホルマリン処理等により調製した死菌も同様に使用可能である。また、ストレプトコッカス・ミュータンスの標準菌株としては、血清型ｃ、ｅ、ｆのいずれも使用可能であり、これらの混合物も使用可能であるが、血清型ｃ又はｅを使用するのが好適である。この場合において、前記したように原料抗体のＳ／Ｍ結合選択性を１００以上、好ましくは１０００以上にするには、親和定数の高い抗体のみならず、親和定数の低い抗体も充分除去する必要があり、そのためには、上述したように、１ｍｇの原料抗体に、４００D_{600}以上の菌体を添加するのが好適である。

アフィニティー精製法における前記Ｍ抗原固定化担体と原料抗体の接触および分離法としては所謂バッチ法およびクロマトグラフィー法の何れの方法も使用可能である。また、両方法を組み合わせて実施することも可能である。

クロマトグラフィー法では、Ｍ抗原固定化担体をカラムに充填後、原料抗体をカラムに添加し、保持されず溶出する画分を分取すればよい。また、バッチ法においては、Ｍ抗原固定化担体を懸濁した液と原料抗体を混合し、抗原抗体反応を十分行わせた後に、例えば遠心処理により上清を回収することで実施できる。

ストレプトコッカス・ミュータンスの菌体をそのまま使用する場合の原料抗体

との接触および分離法は、上記バッチ法と同様であり、菌体懸濁液と原料抗体を混合し、抗原抗体反応を十分行わせた後に、例えば遠心処理により上清を回収することで実施できる。

本発明者らはこの様な方法により、S／M結合選択性１００以上のポリクローナル抗体として、ウサギ由来のポリクローナル抗体であるα６７１５、αＢ１３、及びα６７１５－Ｂ１３を取得した。

また、アフィニティー精製法により交差反応性抗体を分離する別の方法として、ストレプトコッカス・ソブリヌスに特異的な菌体表面抗原を固定化した不溶性担体（以下、「Ｓ抗原固定化担体」ともいう。）と原料抗体とを接触させ、ストレプトコッカス・ソブリヌス対する結合能の高い抗体を吸着させ、吸着された抗体をｐＨ、イオン強度又は誘電率を変化させる等従来公知の方法で遊離することにより、Ｓ／Ｍ結合選択性１００以上の抗体を得ることもできる。この場合も、バッチ法またはクロマトグラフィー法のどちらも好適に使用することが出来る。

交差反応性抗体を除去した後のポリクローナル抗体中には、菌体由来の成分が混入している場合があるため、抗体画分に精製することが好ましい。精製方法としては塩析法、ゲル濾過法、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、電気泳動法等の公知の方法が制限なく使用できるが、操作の簡便性および抗体画分を特異的に回収出来ることからプロテインＡを用いたアフィニティークロマトグラフィー法を採用するのが特に好適である。

上記のようにして取得した各種Ｓ抗体は、それぞれ単独で使用することもできるが、性質の異なる抗体を混合して使用する事もできる。例えば、ストレプトコッカス・ソブリヌスの血清型ｄ株に対する反応性が血清型ｇ株に対する反応性の２倍以上の抗体と、血清型ｇ株に対する反応性が血清型ｄ株に対する反応性の２倍以上の抗体を適宜混合して、血清型ｄ及びｇ株に対する反応性を同等として用いることも可能である。

本発明の測定方法では、Ｓ抗体とストレプトコッカス・ミュータンスに対して特異的に結合する抗体（以下、「Ｍ抗体」ともいう。）を併用して、被検体液中のストレプトコッカス・ソブリヌス量及びストレプトコッカス・ミュータンス量

を同時に測定することもできる。

ここで、ストレプトコッカス・ミュータンスに対して特異的に結合する抗体（M抗体）とは、ストレプトコッカス・ミュータンスに対して高い結合能を示し、他の口腔内細菌、特にストレプトコッカス・ソブリヌスを含む他の口腔内レンサ球菌に対してはバックグラウンド以下の結合能しか示さない抗体を指す。なお、該抗体におけるグロブリンクラスは特に限定されず、現在知られているどのようなグロブリンクラスのものも含まれる。更に、通常の抗体分子のみならず、該抗体の部分分解物（Ｆａｂ、Ｆａｂ’、Ｆａｂ’２等）、及び該抗体の活性フラグメント（抗体の抗原認識部位）が存在する部分構造等も含まれる。

このような抗体は公知であり、具体例として、特開平１０－３６４００号記載のモノクローナル抗体を例示することができるが、上記のような性質を満たす抗体であれば特に限定されず、公知の方法で作製したポリクローナル抗体及びモノクローナル抗体が何ら制限なく使用できる。例えば、上記抗体がポリクローナル抗体である場合には、免疫動物にストレプトコッカス・ミュータンスの全菌体または該全菌体より得られる抗原抽出物を免疫してストレプトコッカス・ミュータンスに対するポリクローナル抗体を得、次いで得られた該ポリクローナル抗体から他の口腔内細菌との交差反応性を有するポリクローナル抗体を除去することにより好適に得る事ができる。尚、交差反応性を有するポリクローナル抗体を除去する方法は、吸着用抗原としてストレプトコッカス・ミュータンス以外の菌体等を使用すること以外、前記Ｓ抗体の取得方法におけるアフィニティー精製法と同様の方法により実施可能である。

また、本発明の測定方法では、Ｓ抗体とストレプトコッカス・ミュータンス及びストレプトコッカス・ソブリヌスに対して特異的に結合する抗体（以下、「ＭＳ抗体」ともいう。）を併用することにより、被検体液中のストレプトコッカス・ソブリヌス量及びストレプトコッカス・ミュータンスとストレプトコッカス・ソブリヌスの総量を同時に測定することもできる。

ここで、ストレプトコッカス・ミュータンス及びストレプトコッカス・ソブリヌスに特異的に結合する抗体（ＭＳ抗体）とは、ストレプトコッカス・ミュータ

ンス及びストレプトコッカス・ソブリヌスに対して高い免疫反応性を示し、他の口腔内細菌に対してはバックグラウンド以下の免疫反応性しか示さない抗体を指す。被検体液中のストレプトコッカス・ミュータンス及びストレプトコッカス・ソブリヌスの総量を定量するためには、抗体のストレプトコッカス・ミュータンスとストレプトコッカス・ソブリヌスに対する結合能が同等であることが好ましい。ここで、ストレプトコッカス・ミュータンスとストレプトコッカス・ソブリヌスに対する免疫反応性（または結合能もしくは単に反応性ともいう）が同等であるとは、従来公知の免疫学的測定方法により、同一菌体量のストレプトコッカス・ミュータンスとストレプトコッカス・ソブリヌスを抗原とし、免疫複合体の検出を行った際に、両者からの検出値の割合が、相互に２倍以内、好ましくは１.５倍以内であることを指す。

該抗体としては、上記性質を満たす抗体であれば従来公知の方法で作製したポリクローナル抗体及びモノクローナル抗体が何ら制限なく使用できる。また、性質の異なる抗体を混合して使用する事もできる。例えば、前記のM抗体とＳ抗体を適宜混合して、ストレプトコッカス・ミュータンスとストレプトコッカス・ソブリヌスに対する反応性を同等として用いることも可能である。

このようにして得られたＳ抗体及び必要に応じて、M抗体又はMＳ抗体を一緒に用いて免疫学的測定方法により被検体液中のストレプトコッカス・ソブリヌス量、並びに必要に応じてストレプトコッカス・ミュータンス量又はストレプトコッカス・ミュータンス及びストレプトコッカス・ソブリヌスの総量を測定する方法は特に限定されず、抗原抗体反応を介して抗原を測定する方法として知られている免疫凝集法、光学免疫測定法、標識免疫測定法、およびこれらの組合わせ等の従来公知の免疫学的測定方法が使用出来る。なお、これらの免疫学的測定は、Ｓ抗体及び必要に応じて、M抗体又はMＳ抗体を含む免疫学的測定試薬を用いて好適に行なうことができる。これら免疫学的測定試薬は、Ｓ抗体及び必要に応じて、M抗体又はMＳ抗体を含む免疫学的測定試薬であればその形態は特に限定されず、該試薬に使用される上記抗体（使用抗体）を含む溶液；使用抗体を粒子やメンブレン等の不溶性担体に固定化したもの或いはこれらの懸濁液；使用抗体に放射性

物質、酵素、各種色素類、コロイド類、各種粒子等の各種標識物質を結合させたもの、或いはその溶液や懸濁液；又はこの様な標識された使用抗体を粒子やメンブレン等の不溶性担体に固定化したもの或いはそれらの懸濁液；及びこれらを組み合わせたもの等、様々な形態をとり得る。

以下、これら免疫学的測定試薬を用いた測定方法について説明する。

〈免疫凝集法〉

該方法は、抗原抗体反応に基づく不溶性担体の凝集反応を利用して、被検体液中のストレプトコッカス・ソブリヌスを検出、定量する方法である。半定量的方法としてはラテックス凝集法、マイクロタイター法等が、定量的測定法としてはラテックス定量法等がある。

例えばラテックス凝集法を利用して被検体液中のストレプトコッカス・ソブリヌスを免疫学的に測定する場合には、ラテックスビーズにＳ抗体を固定化した抗体感作粒子（Ｓ抗体感作粒子ともいう。）からなる測定試薬を作製後、該測定試薬と被検体液を混合し、抗原抗体反応後における感作粒子の凝集の度合を、目視、或いは光学的測定法等により検出することで測定することが出来る。

このとき、ラテックスビーズにＭ抗体又はＭＳ抗体を固定化した抗体感作粒子（それぞれＭ抗体感作粒子及びＭＳ抗体感作粒子ともいう。）からなる測定試薬を別途作製し、上記Ｓ抗体感作粒子の懸濁液とＭ抗体感作粒子又はＭＳ抗体感作粒子の懸濁液を別々の試験管に入れ、更にこれら試験管に同一被検体液由来の被検体液を入れて混合し、抗原抗体反応後における各感作粒子の凝集度合を、目視、或いは光学的測定法等により同一被検体液中のストレプトコッカス・ミュータンス量又はストレプトコッカス・ミュータンスとストレプトコッカス・ソブリヌスとの総量を合わせて測定することが出来る。

〈光学免疫測定法〉

該方法は、Ｓ抗体と被検体液とを接触させて抗原抗体反応を行った場合に、抗原抗体反応の結果生じる凝集物の濁度の変化を検出する方法、Ｓ抗体を透明な支持体上に固定化した測定試薬に被検体液を接触させ、抗原抗体反応の結果粒子状の菌体が透明支持体上に反応することによる透過度の変化を検出する方法、又は

Ｓ抗体を固定化した薄層（以下、抗体層ともいう。）に被検体液を接触させ、抗原抗体反応の結果生じる抗体層の屈折率の変化を透過光や表面プラズモン波等の変化として検出する方法等、抗原抗体反応の有無を光学的に検出する方法のことである。

〈標識免疫測定法〉

該方法では、Ｓ抗体に放射性物質、酵素、各種色素類、コロイド類、各種粒子等の各種標識物質を反応させて得た標識抗体を含む測定試薬と、被検体液とを接触させて抗原抗体反応を行った後に、被検体液中のストレプトコッカス・ソブリヌスに反応した標識物質の量、すなわち標識物質に由来する放射活性、酵素活性、蛍光強度、着色等を測定することによって、被検体液中のストレプトコッカス・ソブリヌスを検出、定量することができる。また、Ｓ抗体を固定化した不溶性担体（粒子、メンブレン、ＥＬＩＳＡプレート等）からなる測定試薬と被検体液とを接触させて抗原抗体反応を行った後に、Ｓ抗体を標識物質で標識した標識抗体を含む別の測定試薬を接触させて更に抗原抗体反応を行った後に、標識物質の量を測定することによって、又は被検体液と標識物質で標識したストレプトコッカス・ソブリヌスの菌体または菌体表面抗原とを混合し、Ｓ抗体を固定化した不溶性担体からなる測定試薬に接触させて抗原抗体反応を行った後に、Ｓ抗体に反応した標識物質の量を測定することによって被検体液中のストレプトコッカス・ソブリヌスを検出、定量することができる。

標識物質としては、放射性物質として放射性ヨード、放射性炭素等が；酵素としてペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、ガラクトシダーゼ等が；各種色素類として、フルオレセインイソチオシアネート、テトラメチルローダミン等の蛍光色素類が；コロイドとして金コロイド、炭素コロイド等が；各種粒子としては着色ラテックス粒子等が使用出来る。なお、酵素標識を行う場合は、チオール基とマレイミド基、アミノ基とアルデヒド基等の共有反応により直接標識する、或いはビオチン－アビジン複合体を介し標識する等の方法が使用可能である。また、標識酵素としてアルカリホスファターゼ及びパーオキシダーゼを使用し、さらに前者の酵素の場合にはジオキセタン誘導体等の化学発光物質を、また後者の

酵素の場合にはルミノール誘導体等の化学発光物質を酵素の基質として使用した場合には、該基質の発光を検出することも出来る。

該標識免疫測定法では、用いる標識に応じて従来使用されている方法が特に限定無く使用できるが、中でも放射性物質を標識として使用する放射免疫測定法；酵素を標識として使用する酵素免疫測定法；色素、特に蛍光色素を標識として利用する蛍光免疫測定法；酵素の基質としての化学発光物質を標識として利用する化学発光免疫測定法等は定量性が高いので、高精度の定量測定を行なう場合にはこれら測定方法を採用するのが好適である。また、コロイドまたは各種粒子を標識として使用するフロースルー免疫測定法、免疫クロマト法、及び免疫濾過法；並びにラテックス凝集法は、操作が簡便であるという特徴がある。

これら各種免疫学的測定方法のなかでも、ラテックス定量法や酵素免疫測定法は、自動分析装置を用いて多数の被検体液を処理することが可能であるので、集団検診等の検査法として好適である。また、フロースルー免疫測定法、免疫クロマト法、およびラテックス凝集法は簡便性に加えて特別な知識や装置を必要とすることなく迅速な測定が可能であり、歯科医院や家庭においても実施可能であるため、汎用的な検査方法として好適である。

これら各種標識免疫測定法における操作、手順等は一般に採用されているそれらと特に異ならず、公知の非競合法や競合法、サンドイッチ法等に準じることが出来る。また、本発明で使用する前記の抗体と共に、上記の各標識物質で標識した二次抗体、プロテインA等の本発明で使用する前記抗体に反応可能な物質を使用してストレプトコッカス・ソブリヌスの検出・定量に用いることもできる。

また、必要に応じて複数の抗体を組み合わせてストレプトコッカス・ソブリヌスの検出、定量に用いることも出来る。例えば、サンドイッチ法の原理に基づく免疫学的測定方法に於いて、固相に固定化する抗体としてモノクローナル抗体を使用し、標識抗体としてポリクローナル抗体を使用することもできる。

例えばフロースルー免疫測定法を利用して被検体液中のストレプトコッカス・ソブリヌスを測定する場合には、S抗体をストレプトコッカス・ソブリヌス捕捉用抗体として多孔性膜上に固定化して測定試薬を得、次いで、該多孔性膜膜表面

に被検体液を接触させた後、多孔性膜表面に垂直方向に被検体液を通過させ、被検体液中のストレプトコッカス・ソブリヌスを多孔性膜に抗原抗体反応により捕捉し、更に、標識したＳ抗体の溶液からなる別の測定試薬を多孔性膜表面に接触させた後、多孔性膜表面に垂直方向に通過させ、多孔性膜上の標識抗体の有無または多寡を測定することで、被検体液中のストレプトコッカス・ソブリヌスを迅速、簡便に測定することが出来る。

該標識免疫測定法では、Ｓ抗体及び、M抗体又はＭＳ抗体を含む測定試薬を用いることにより、被検体液中のストレプトコッカス・ソブリヌス量と、ストレプトコッカス・ミュータンス量又はストレプトコッカス・ミュータンスとストレプトコッカス・ソブリヌスとの総量とを同時に測定することもできる。このことにより、結果として従来の培養法による測定と同様に口腔内に存在するミュータンスレンサ球菌のほぼ全量を併せて知ることができ、従来法との対応を確認することが可能となる。

上記のＳ抗体及び、M抗体又はＭＳ抗体を含む測定試薬を用いた測定は、Ｓ抗体とM抗体又はＭＳ抗体とをそれぞれ異なる標識物質と反応させて得た標識抗体を含む測定試薬と、被検体液とを接触させて抗原抗体反応を行った後に、被検体液中のストレプトコッカス・ソブリヌスに反応した標識物質の量、及び被検体液中のストレプトコッカス・ミュータンスに反応した標識物質の量又はストレプトコッカス・ミュータンスとストレプトコッカス・ソブリヌスとの両方に反応した標識物質の量を区別して同時に測定すればよい。また、Ｓ抗体及びM抗体又はＭＳ抗体を同一の不溶性担体（メンブレン、ＥＬＩＳＡプレート等）の異なる位置に固定化した測定試薬を使用し、被検体液と接触させて抗原抗体反応を行った後に、Ｓ抗体とM抗体又はＭＳ抗体とを標識物質と反応させて得た標識Ｓ抗体及び標識M抗体又は標識ＭＳ抗体からなる別の測定試薬を接触させて更に抗原抗体反応を行った後に、不溶性担体に反応した標識物質の量を測定することもできる。さらに、被検体液と標識物質で標識したストレプトコッカス・ソブリヌスの菌体または菌体表面抗原、及び標識物質で標識したストレプトコッカス・ミュータンスの菌体または菌体表面抗原とを混合し、Ｓ抗体及びM抗体又はＭＳ抗体を固定

化した不溶性担体からなる測定試薬に接触させて抗原抗体反応を行った後に、S抗体及びM抗体又はMS抗体に反応した標識物質の量を同時に測定することによって実施可能である。このとき、それぞれの抗体を別個に固定化した不溶性担体を並列して使用することも可能であるし、同一の不溶性担体の異なる位置にそれぞれの抗体を固定化したものを使用することもできる。

例えばフロースルー免疫測定法を利用して被検体液中のストレプトコッカス・ソブリヌス量及びストレプトコッカス・ミュータンス量を同時に測定する場合には、S抗体をストレプトコッカス・ソブリヌス捕捉用抗体として、またM抗体をストレプトコッカス・ミュータンス捕捉用抗体として、それぞれ多孔性膜上の区別可能な位置に固定化して測定試薬を得、次いで、該多孔性膜膜表面に被検体液を接触させた後、多孔性膜表面に垂直方向に被検体液を通過させ、被検体液中のストレプトコッカス・ソブリヌス及びストレプトコッカス・ミュータンスを多孔性膜に抗原抗体反応によりそれぞれ区別される位置に捕捉し、更に、それぞれ同一又は別の標識物質により標識したS抗体及びM抗体の溶液を多孔性膜表面に接触させた後、多孔性膜表面に垂直方向に通過させ、多孔性膜上のそれぞれ区別される位置上の標識抗体の有無または多寡を同時に測定することで、被検体液中のストレプトコッカス・ソブリヌス量及びストレプトコッカス・ミュータンス量を同時に、且つ迅速、簡便に測定することが出来る。また、S抗体及びMS抗体を含む試薬を用いて同様の操作によりストレプトコッカス・ソブリヌス量とストレプトコッカス・ミュータンスとストレプトコッカス・ソブリヌスの総量とを同時に測定することもできる。

前記したように免疫クロマト法は、歯科医院や家庭においても実施可能な方法であるが、本発明者らは、該方法で一般的に使用される免疫クロマト法ストリップ（単に、ストリップとも言う。）と呼ばれる測定試薬にS抗体を用いることによりその検出限界を高め、被検体液中のストレプトコッカス・ソブリヌスを高感度で測定することに成功した。このことにより、上記S抗体を用いたストリップを使用した免疫クロマト法（以下、本発明の免疫クロマト法ともいう。）は、優れた汎用的な齲蝕危険度の判定検査方法となり得る。そこで、以下に図を参照し

て該方法について詳しく説明する。

図２に本発明の免疫クロマト法で好適に使用できる代表的なストリップ１の構造を、又図１には該ストリップ１の各部材の該略図を示す。該ストリップ１は、従来のストリップと同様に、それぞれ目的に応じた多孔性支持体からなる各部材、すなわち被検体液を一時的に吸収、保持するためのサンプルパッド２、標識抗体を一時的に保持するためのコンジュゲートパッド３、検出用抗体が固定化される展開メンブレン４、およびサンプルパッド２より展開された被検体液を吸収するための吸収パッド５がこの順番で接合された構造からなる。ストリップ１におけるコンジュゲートパッド３には、被検体液中のストレプトコッカス・ソブリヌスを標識するための抗体（以下、「標識抗体」という。該標識抗体としては、例えば金コロイド等の標識物質で標識したＳ抗体が使用できる。）が塗布･乾燥することにより保持されており、また、上記展開メンブレン４上の検出ライン６には、被検体液中のストレプトコッカス・ソブリヌスを捕捉するための検出用抗体としてＳ抗体が固定化されている。なお、図１及び図２中に示される各寸法（長さ）は、単に大きさの目安を示すものであり、本発明の免疫クロマト法で使用するストリップの大きさは、これら図に示される値に限定されるものではない。

上記各部材を構成する多孔性支持体に用いる材料は特に限定されず、各部材の目的に応じて吸湿性材料、多孔質材料、繊維質材料等から適宜選択される。例えば、サンプルパッド２としては、濾紙、吸取紙等を用いるのが好適であり、コンジュゲートパッド３としてはガラス繊維布、ポリプロピレン不織布、ガラスフィルター等を用いるのが好適である。また展開メンブレン４としてはニトロセルロース、或いは酢酸セルロースを含むニトロセルロース等を用いるのが好適であり、吸収パッド５としては濾紙、吸取紙等を用いるのが好適である。

なお、検出用抗体及びコントロール抗体の展開メンブレン４への固定化方法は特に限定されず、従来公知の物理的吸着法や共有反応法が何ら制限無く使用出来るし、他のタンパク質等と混合して固定化することも出来る。また、展開メンブレンへの被検体液成分の非特異的吸着を抑制する、或いは展開メンブレンへの被検体液の湿潤性を向上するため抗体固定化後の展開メンブレンを公知の方法によ

りタンパク質、脂質、高分子化合物等によりブロッキング処理することも出来る。このブロッキング処理に用いるタンパク質等は特に限定されるものではないが、一般的な免疫学的測定法において、非特異的反応を抑制する目的で使用されているＢＳＡ、スキムミルク等が好適である。また、被検体液が展開メンブレンを均一に展開するように、展開メンブレンの吸水性を調整するために、展開メンブレンの表面に親水性重合体や界面活性剤を被覆または含浸させることも出来る。

なお、コンジュゲートパッド３については、被検体液を添加したときに、ストレプトコッカス・ソブリヌスと標識抗体との複合体が、この部分から容易に脱離するように、水溶性重合体、またはサッカロース等の糖類で予めブロッキングした後標識抗体を添加してから乾燥させる、或いは標識抗体を予め水溶性重合体、またはサッカロース等の糖類と混合してからコンジュゲートパッドに塗布し乾燥させるのが好ましい。上記水溶性重合体としては、ポリビニルピロリドン、ポリビニルアルコール、ポリエチレングリコール、セルロースエーテル（メチルセルロース、エチルセルロース、カルボキシメチルセルロース、カルボキシエチルセルロース、オキシエチルセルロース、シアンエチルセルロース等）、ゼラチン等が使用できる。

また、標識抗体を調製するための標識物質としては、金コロイド、炭素コロイド、着色ラテックス等の目視によって確認できる標識物が使用出来る他、放射性物質や蛍光物質も使用可能である。また、標識物質として酵素を利用し、抗原抗体反応の後に基質を添加して、酵素反応により生じる化合物を検出することも出来る。抗体の標識化は特に限定されず、従来一般的に採用されている方法により行なうことができる。

本発明の免疫クロマト法では、前記ストリップ１のコンジュゲートパッド３の近傍に位置するサンプルパッド２に被検体液を添加し、室温で１〜３０分間放置することにより被検体液とともに標識抗体を検出ライン６まで展開し、サンドイッチ法の原理に基づいて、展開液中の標識抗体と反応したストレプトコッカス・ソブリヌスを検出用抗体にて検出ライン６上に捕捉し、捕捉されたストレプトコッカス・ソブリヌスに反応した標識抗体を検出することにより、被検体中のストレ

プトコッカス・ソブリヌスの有無またはその多寡を測定することが出来る。このときに標識抗体が被検体液と共に正常に展開されていることは、上記検出ライン６の上流のコントロール判定ライン７に標識抗体と反応する抗体を固定化しておき、この位置で標識抗体が検出されることにより確認することができる。なお、図１に示される展開メンブレン４上の検出ライン６及びコントロール判定ライン７の位置、順、形状、数等は一例であり特に限定されるものではない。

以上、標識抗体を予め塗布して乾燥させたストリップを用いた免疫クロマト法について説明したが、標識抗体を予め被検体液と混合し抗原抗体反応を行わせた後に、該混合液を検出用抗体が固定化された多孔性支持体の一端に添加するという方法でも測定可能である。

また、本発明の免疫クロマト法においては、図３に示すようなコンジュゲートパッド３に標識抗体として、金コロイド等の標識物質で標識したＳ抗体（標識Ｓ抗体）及びM抗体（標識M抗体）が塗布･乾燥することにより保持され、また、上記展開メンブレン４上の検出ライン６ａ及び６ｂに検出用抗体としてそれぞれＳ抗体及びM抗体が固定化されたストリップを用いることにより、上記と同様な原理により、被検体液中のストレプトコッカス・ソブリヌス及びストレプトコッカス・ミュータンスの量を同時に測定することもできる。なお、図３には検出ライン６ａ及び検出ライン６ｂが展開メンブレン４の被検体液が展開される下流側の端部から展開方向に異なる距離になるようにライン状（帯状）に直列的に配置された態様を示したが、各検出用抗体の固定化位置、固定化部分の大きさ、形状は特に限定されるものではない。例えば、図４に示されるように展開メンブレン４上の検出ライン６の位置に、Ｓ抗体及びM抗体を、展開メンブレン４の被検体液が展開される下流側の端部から展開方向に同じ距離になるように並列に、円状或いはスポット状に固定化してもよい。また、両抗体が固定化される部分は完全に分離される必要はなく、交互に交差した形状等、目視にて容易に識別可能な任意の形状、位置関係とすることが可能である。

また、上記した図３及び図４に示したような展開メンブレン４を用いた各ストリップにおいて検出用抗体および標識抗体として使用するM抗体に変えてＭＳ抗

体を使用することにより被検体液中のストレプトコッカス・ソブリヌス量とストレプトコッカス・ミュータンスとストレプトコッカス・ソブリヌスとの総量を同時に測定することもできる。

本免疫クロマト法による測定においては、例えば以下のような手順で測定を行なうことにより、迅速簡便に被験者の口腔内に存在するストレプトコッカス・ソブリヌスの量を知ることができ、齲蝕危険度を診断判定することができる。

即ち、まず、①口腔内より歯垢或いは唾液を採取（スパチュラ、又は綿棒で歯垢を採取、或いはスポイトで唾液を採取）し、②採取物が唾液である場合にはそのまま、或いは検体希釈液に懸濁させ、また、採取物が歯垢である場合には検体希釈液に懸濁させた後必要に応じて超音波を当てる等の歯垢の分散処理を施して被検体液を調製し、③被検体液（例えば１００～２００μｌ）を分取し、前記ストリップのサンプルパッドに添加し、所定時間（例えば１～３０分）静置した後、該ストリップの検出ライン６及びコントロール判定ライン７の着色の有無あるいはその状態により判定することによりストレプトコッカス・ソブリヌスが存在するか否か、或いはその量を知ることができる。

例えば、後述する実施例のようにして調製した被検体液について金コロイドを標識物質として用いて測定を行なった場合には、被検体液中のストレプトコッカス・ソブリヌスの濃度により検出ライン６の金コロイドによる着色の程度は表１に示す様に変化するので、表２の基準に従い齲蝕危険度を診断判定することができる。なお、表２では特定の稀釈倍率で調製した被検体液の菌体濃度を基準とした例を示したが、被検体液調製時の稀釈倍率から歯垢又は唾液の単位量当たりの菌体濃度を換算し、これを判定基準としてもよいことは勿論である。

表１

ストレプトコッカス・ソブリヌス菌数(個/ml)	10^7	10^6	10^5	$<10^5$
検出ラインの色	濃赤色	赤色	薄赤色	無色
判　定	＋＋＋	＋＋	＋	－

表2

検出ライン	コントロールライン	判定	齲蝕危険度
濃赤色～赤色	赤色～濃赤色	＋＋＋～＋＋	危険度が高い
赤色～薄赤色	赤色～濃赤色	＋＋～＋	危険度は中程度
薄赤色	赤色～濃赤色	＋	危険度は低い
無色	赤色～濃赤色	－	危険度はない
薄赤色～濃赤色	無色	再検査	判定不可
無色	無色	再検査	判定不可

また、M抗体を併用し、金コロイドを標識物質として用いた図３に示すようなストリップを用い、上記と同様な手順で測定を行なった場合には、被検体液中のストレプトコッカス・ソブリヌス及びストレプトコッカス・ミュータンスの濃度により、検出ライン６ａ及び検出ライン６ｂの金コロイドによる着色の程度は表３に示す様に変化するので、表４の基準に従いより高精度の齲蝕危険度を診断判定することができる。尚、表４における齲蝕危険度を示す指標ＡＡＡ～Ｄは、それぞれ「ＡＡＡ～Ａ：危険度が高い」、「ＢＢ～Ｂ：危険度は中程度」、「Ｃ：危険度は低い」、「Ｄ：危険度はない」を意味する。

表3

ストレプトコッカス・ソブリヌス				
ストレプトコッカス・ソブリヌス菌数(個/ml)	10^7	10^6	10^5	$<10^5$
検出ラインの色	濃赤色	赤色	薄赤色	無色
判 定	＋＋＋	＋＋	＋	－
ストレプトコッカス・ミュータンス				
ストレプトコッカス・ミュータンス菌数(個/ml)	10^7	10^6	10^5	$<10^5$
検出ラインの色	濃赤色	赤色	薄赤色	無色
判 定	＋＋＋	＋＋	＋	－

表4

		ストレプトコッカス・ソブリヌス判定			
		＋＋＋～＋＋	＋＋～＋	＋	－
ストレプトコッカス・ミュータンス 判定	＋＋＋～＋＋	AAA	AA	A	BB
	＋＋～＋	AA	A	BB	B
	＋	A	BB	B	C
	－	A	B	C	D

また、ＭＳ抗体を併用し、金コロイドを標識物質として用いた図３に示すようなストリップを用い、上記と同様な手順で測定を行なった場合には、被検体液中のストレプトコッカス・ソブリヌス及びストレプトコッカス・ミュータンスの濃度により、検出ライン６ａ及び検出ライン６ｂの金コロイドによる着色の程度は表５に示す様に変化するので、表６の基準に従いより高精度の齲蝕危険度を診断判定することができる。尚、表６における齲蝕危険度を示す指標ＡＡＡ～Ｄは、表４におけるのと同じである。

このようにして免疫クロマト法により、齲蝕原因菌として特に重要であるストレプトコッカス・ソブリヌスの量、および必要に応じてストレプトコッカス・ミュータンス量、或いはストレプトコッカス・ミュータンス量とストレプトコッカス・ソブリヌスの総量を迅速簡便に測定することができ、被験者の齲蝕危険度を診断判定することができる。

表5

ストレプトコッカス・ソブリヌス				
ストレプトコッカス・ソブリヌス菌数(個/ml)	10^7	10^6	10^5	＜10^5
検出ラインの色	濃赤色	赤色	薄赤色	無色
判　定	＋＋＋	＋＋	＋	−
ストレプトコッカス・ミュータンス及び ストレプトコッカス・ソブリヌス				
ストレプトコッカス・ミュータンス及びストレプトコッカス・ソブリヌス総菌数(個/ml)	10^7	10^6	10^5	＜10^5
検出ラインの色	濃赤色	赤色	薄赤色	無色
判　定	＋＋＋	＋＋	＋	−

表6

		ストレプトコッカス・ソブリヌス判定			
		+++〜++	++〜+	+	−
ストレプトコッカス・ミュータンスとストレプトコッカス・ソブリヌスの総量の判定	+++〜++	AAA	AA	A	BB
	++〜+		A	BB	B
	+			B	C
	−				D

以下、実施例により本発明を具体的に説明するが、本発明は以下の実施例により限定されるものではない。

製造例１　ストレプトコッカス・ソブリヌスに対するポリクローナル抗体の作製、抗体の反応性評価

（１）菌体試料懸濁液の調製

ＢＨＩ（ＤＩＦＣＯ社）３．７ｇを１００ｍｌの超純水に溶解後、オートクレーブ処理し、ＢＨＩ液体培地を調製した。ＢＨＩ液体培地２ｍｌ中で６７１５（ストレプトコッカス・ソブリヌス、血清型ｇ）を３７℃、５時間、嫌気条件下（N_2：H_2：CO_2＝８０：１０：１０）で培養した後、培養液を４０００ｇ、５分

遠心処理し、上清の培地成分を除去し菌体沈殿を回収した。次いで、沈殿物を５ｍｌのＰＢＳに懸濁させて、同様の遠心分離をする操作を３回行い、沈殿物を洗浄した。その後得られた菌体沈殿をＰＢＳに懸濁し、A_{600}＝１．０に調整し菌体試料懸濁液とした。なお、該菌体試料懸濁液を超音波処理後、適宜希釈した後にＢＨＩ培地プレート上に添加し、生じたコロニー数を計数し菌体試料懸濁液のの希釈倍率を乗じることで該菌体試料懸濁液の菌体濃度を求めたところ、約１×10^9個／ｍｌであった。

同様の操作により、Ｂ１３（ストレプトコッカス・ソブリヌス、血清型ｄ）、Ｉｎｇｂｒｉｔｔ（ストレプトコッカス・ミュータンス、血清型ｃ）、Ｐ４（ストレプトコッカス・ミュータンス、血清型ｅ）、ＯＭＺ１７５（ストレプトコッカス・ミュータンス、血清型ｆ）、ＡＴＣＣ１０５５６（ストレプトコッカス・サンギス）、ＩＦＯ１４２５２（ストレプトコッカス・サリバリウス）、ＡＴＣＣ４９４５６（ストレプトコッカス・ミティス）、ＡＴＣＣ３５０３７（ストレプトコッカス・オラリス）、Ｃｈａｒｉｓ（ストレプトコッカス・ゴルドニー）の菌体試料懸濁液を調製した。なお、ここで６７１５、Ｂ１３、Ｉｎｇｂｒｉｔｔ、Ｃｈａｒｉｓ等は標準菌株の菌株名を、ＡＴＣＣ１０５５６、ＩＦＯ１４２５２等は標準菌株の寄託番号を示す。

（２）ストレプトコッカス・ソブリヌスに対する抗血清の作製

オートクレーブ処理したＢＨＩ液体培地１００ｍｌ中で６７１５（ストレプトコッカス・ソブリヌス、血清型ｇ）を３７℃、５時間、嫌気条件下（N_2：H_2：CO_2＝８０：１０：１０）で培養した。培養液を４０００ｇ、５分遠心処理し、上清の培地成分を除去し菌体沈殿を回収した。次いで、沈殿物を１００ｍｌのＰＢＳに懸濁させて、同様の遠心分離をする操作を３回行い、沈殿物を洗浄した。菌体沈殿を回収、秤量し、１０ｍｇ湿菌／ｍｌの６７１５の菌体懸濁液を調製した。該菌体懸濁液を、５ｍｇ湿菌／ｍｌとなるよう０．５％ホルマリン－ＰＢＳで倍希釈し菌体抗原懸濁液とし、懸濁状態で４℃にて保存した。

該菌体抗原懸濁液それぞれ各１ｍｌを、１週間の内に１日於きに３回ウサギに対し耳介静脈注射した。同様の免疫操作を第２週、第３週と、計６回行った。更

に菌体抗原懸濁液０．５ｍｌを等量のアジュバンドと混合し、ウサギの皮下に２回注射した。力価の上昇をスライドグラスを利用した菌体の凝集反応の程度により確認後、最終免疫より１週間後に、定法に従い採血しストレプトコッカス・ソブリヌスに対する抗血清を得た。

（３）ストレプトコッカス・ソブリヌスに対するポリクローナル抗体の精製

（１）の方法に従い、Ｉｎｇｂｒｉｔｔ（ストレプトコッカス・ミュータンス、血清型ｃ）、Ｐ４（ストレプトコッカス・ミュータンス、血清型ｅ）、及びＯＭＺ１７５（ストレプトコッカス・ミュータンス、血清型ｆ）をそれぞれ約2×10^{10}個／ｍｌ含む菌体懸濁液１０ｍｌを調製した。

次いで該菌体懸濁液と、（２）で得られた抗血清０．５ｍｌを混合し4℃、６０分反応した。混合液を４０００ｇ、５分遠心処理後上清を分取し、０．２２μｍフィルターで濾過した。

次いで、あらかじめＰＢＳで平衡化した１ｍｌのプロテインＡ－セファロース（ファルマシア社）を充填したカラムに上清試料を添加し、５ｍｌのＰＢＳでカラムを洗浄後、５ｍｌの０．１Ｍグリシン－塩酸緩衝液（ｐＨ３．０）にて溶出し、直ちに１００ｍＭトリス－塩酸（ｐＨ９．０）を添加しｐＨ７．４に調整した。ＩｇＧの溶出画分は、A_{280}を測定することで確認した。０．５ｍｌの抗血清より、約4ｍｇのＩｇＧを回収した。

（４）直接ＥＬＩＳＡ法によるストレプトコッカス・ソブリヌスに対するポリクローナル抗体の評価

上記（３）で精製したストレプトコッカス・ソブリヌスに対するポリクローナル抗体（以下「α６７１５」と表記することもある）と、各菌体との反応性評価は、以下の直接ＥＬＩＳＡ法により行った。

すなわち、先ず、上記（１）の方法で得られた菌体試料懸濁液を、０．１Ｍ炭酸緩衝液（ｐＨ９．０）にて1×10^{4}～10^{9}個／ｍｌとなるよう希釈したものを、９６穴イムノプレート（Ｎｕｎｃ社、Ｍａｘｉｓｏｒｐ）の各ウェルに５０μｌずつ添加し、4℃、１２時間放置し固定した。イムノプレートから菌体懸濁液を除去し、３００μｌのＰＢＳで3回洗浄した。

次いで、イムノプレートの各ウェルに、2%ＢＳＡ－０．１M炭酸緩衝液（ｐＨ９．０）を３００μｌ添加し、３７℃、２時間放置した後、イムノプレートから2%ＢＳＡ－炭酸緩衝液（ｐＨ９．０）を除去し、３００μｌの０．０５%Ｔｗｅｅｎ２０－ＰＢＳ（ｐＨ７．４）で3回洗浄した。

次いで、α６７１５を、1%ＢＳＡ－０．０５%Ｔｗｅｅｎ２０－ＰＢＳ（ｐＨ７．４）にて１．０μｇ／ｍｌとなるよう希釈し、イムノプレートの各ウェルに５０μｌ添加し、３７℃、１時間放置した後、イムノプレートから溶液を除去し、３００μｌの０．０５%Ｔｗｅｅｎ２０－ＰＢＳ（ｐＨ７．４）で3回洗浄した。

次いで、アルカリホスファターゼ標識抗ウサギＩｇＧ（Ｆｃ）ポリクローナル抗体（ヤギ）（カッペル社）を、1%ＢＳＡ－０．０５%Ｔｗｅｅｎ２０－ＰＢＳ（ｐＨ７．４）にて１０μｇ／ｍｌとなるよう希釈し、イムノプレートの各ウェルに５０μｌ添加し、３７℃、１時間放置した後、イムノプレートから溶液を除去し、３００μｌの０．０５%Ｔｗｅｅｎ２０－ＰＢＳ（ｐＨ７．４）で3回洗浄した。

次いで、発色基質溶液として、ｐ－ニトロフェニルリン酸の２－エタノールアミン水溶液（ＢＩＯＲAD社）を各ウェルに５０μｌずつ添加し、室温下２０分反応した。反応後、０．４MのＮａＯＨを各ウェルに５０μｌずつ添加し反応を停止し、４０５ｎｍの吸光度を測定した。結果を表７に示す。

表7

菌株	菌種／血清型	菌数(個/ウェル)	A_{405}
B13	ストレプトコッカス・ソブリヌス/d	5×10^{2}	0.005
B13	ストレプトコッカス・ソブリヌス/d	5×10^{3}	0.011
B13	ストレプトコッカス・ソブリヌス/d	5×10^{4}	0.062
B13	ストレプトコッカス・ソブリヌス/d	5×10^{5}	0.640
B13	ストレプトコッカス・ソブリヌス/d	5×10^{6}	1.635
B13	ストレプトコッカス・ソブリヌス/d	5×10^{7}	>2.000
6715	ストレプトコッカス・ソブリヌス/g	5×10^{2}	0.004
6715	ストレプトコッカス・ソブリヌス/g	5×10^{3}	0.013
6715	ストレプトコッカス・ソブリヌス/g	5×10^{4}	0.080
6715	ストレプトコッカス・ソブリヌス/g	5×10^{5}	0.653
6715	ストレプトコッカス・ソブリヌス/g	5×10^{6}	1.682
6715	ストレプトコッカス・ソブリヌス/g	5×10^{7}	>2.000
Ingbritt	ストレプトコッカス・ミュータンス/c	5×10^{5}	0.005
Ingbritt	ストレプトコッカス・ミュータンス/c	5×10^{6}	0.004
Ingbritt	ストレプトコッカス・ミュータンス/c	5×10^{7}	0.012
P4	ストレプトコッカス・ミュータンス/e	5×10^{5}	0.004
P4	ストレプトコッカス・ミュータンス/e	5×10^{6}	0.003
P4	ストレプトコッカス・ミュータンス/e	5×10^{7}	0.010
OMZ175	ストレプトコッカス・ミュータンス/f	5×10^{5}	0.004
OMZ175	ストレプトコッカス・ミュータンス/f	5×10^{6}	0.006
OMZ175	ストレプトコッカス・ミュータンス/f	5×10^{7}	0.013
ATCC10556	ストレプトコッカス・サンギス	5×10^{7}	0.004
IFO14252	ストレプトコッカス・サリバリウス	5×10^{7}	0.003
ATCC49456	ストレプトコッカス・ミティス	5×10^{7}	0.004
ATCC35037	ストレプトコッカス・オラリス	5×10^{7}	0.006
Charis	ストレプトコッカス・ゴルドニー	5×10^{7}	0.007

（５）競合ＥＬＩＳＡ法によるストレプトコッカス・ソブリヌスに対するポリクローナル抗体の評価

α６７１５と、各菌体との反応性は、以下の競合ＥＬＩＳＡ法によっても評価した。

すなわち、先ず、上記（４）と同様にして、菌体を固定化し、ＢＳＡでブロッキングしたイムノプレートを作製した。次いで、イムノプレートの各ウェルに、α６７１５を１．０μｇ／ｍｌ含み、更にストレプトコッカス・ミュータンス、或いはストレプトコッカス・ソブリヌスの菌体を10^5～10^9個／ｍｌ含む１％ＢＳＡ－０．０５％Ｔｗｅｅｎ２０－ＰＢＳ（ｐＨ７．４）溶液５０μｌを添加し、３７℃、１時間放置した後、イムノプレートから溶液を除去し、３００μｌの０．０５％Ｔｗｅｅｎ２０－ＰＢＳ（ｐＨ７．４）で３回洗浄した。

次いで、上記（４）と同様にして、アルカリホスファターゼ標識した抗ウサギＩｇＧ抗体を添加した後、発色基質溶液を添加し、４０５ｎｍの吸光度を測定した。結果を表８に示す。

表８

6715固定化量（個/ウェル）	添加した菌株	菌株の添加量（個/ウェル）	A_{405}
5×10^5	6715	5×10^7	0.018
5×10^5	6715	5×10^6	0.078
5×10^5	6715	5×10^5	0.184
5×10^5	6715	5×10^4	0.309
5×10^5	6715	5×10^3	0.325
5×10^5	6715	0	0.320
5×10^5	Ingbritt	5×10^7	0.293
5×10^5	Ingbritt	5×10^6	0.325
5×10^5	Ingbritt	5×10^5	0.319
5×10^5	Ingbritt	5×10^4	0.321
5×10^5	Ingbritt	5×10^3	0.320
5×10^5	Ingbritt	0	0.319

表7より、5×10^{5}個／ウェルから5×10^{7}個／ウェルの範囲において、同一菌体量のストレプトコッカス・ソブリヌスとストレプトコッカス・ミュータンスを抗原とし、抗原抗体反応の検出を行った際に、ストレプトコッカス・ソブリヌスを抗原として使用した場合に検出される反応が、ストレプトコッカス・ミュータンスを抗原として使用した場合に検出される反応の100倍以上であることが分かる。さらに、5×10^{7}個／ウェルのストレプトコッカス・ミュータンスを抗原として使用した場合に検出される反応と同一の反応が検出されるストレプトコッカス・ソブリヌスの抗原量は5×10^{4}個／ウェル以下であることから、α6715のストレプトコッカス・ソブリヌスに対する反応性は、ストレプトコッカス・ミュータンスに対する反応性の1000倍以上であることが分かる。

また、表8より、5×10^{7}個／ウェルのストレプトコッカス・ミュータンスを添加した場合に検出される阻害反応は、5×10^{5}個／ウェル以下のストレプトコッカス・ソブリヌスを添加した場合に検出される阻害反応と同等であり、ストレプトコッカス・ソブリヌスに対する反応性が、ストレプトコッカス・ミュータンスに対する反応性の100倍以上であることが分かる。

実施例1　ストレプトコッカス・ソブリヌス測定用免疫クロマト法ストリップの作製、評価

（1）金コロイド標識されたストレプトコッカス・ソブリヌスに対するポリクローナル抗体の調製

コロイド粒径が40nmの市販金コロイド溶液（EY Laboratory）10ml に100mMK_2CO_3を88μl添加し、pHを9．0に調製後、0．22μmフィルター処理した。金コロイド溶液の520nmの吸光度を測定したところ、A_{520}＝1．0であった。

次いで、1mg／mlに調整したα6715の2mMホウ酸緩衝溶液（pH9．0）64μlを、上記金コロイド溶液に撹拌しながら添加し、室温下5分放置した。次いで、10%スキムミルク－2mMホウ酸緩衝液（pH9．0）を1．1ml撹拌しながら添加し（スキムミルク終濃度1%）、室温下30分放置した。次いで、反応溶液を10℃、10000g、30分遠心処理し、上清を除去後、

2ｍｌの2ｍMPBS（ｐＨ7．4）を添加し、下層の金コロイド画分を再懸濁した。該再懸濁した画分の５２０ｎｍの吸光度を測定したところ、A_{520}＝4．9であった。得られた金コロイド画分（以下、「金コロイド標識α６７１５」と表記することもある）は、4℃にて保存した。

（2）免疫クロマト法ストリップの作製

ニトロセルロースメンブレン（ＭＩＬＬＩＰＯＲＥ社、Ｈｉ－Ｆｌｏｗ Ｍｅｍｂｒａｎｅ、SN、２５mm×６mm）からなる展開メンブレン4上の検出ライン6及びコントロール判定ライン７上に、それぞれ１ｍｇ／ｍｌのα６７１５及び抗ウサギＩｇＧ（Ｈ＋Ｌ）ポリクローナル抗体１μｌをスポットし、インキュベーター内で３７℃、６０分乾燥し抗体を固定化した。該抗体固定化メンブレンを1％スキムミルク－0．01％ＴｒｉｔｏｎＸ１００水溶液中で室温下、5分振とうした。次いで、該メンブレンを１０mMリン酸緩衝液（ｐＨ7．4）中で室温下、１０分振とう後取り出し、真空ポンプで吸引しながら６０分間デシケーター中で乾燥した。

また、コンジュゲートパッド3（ＭＩＬＬＩＰＯＲＥ社、7．5mm×６mm）を0．5％ＰＶＡ－0．5％ショ糖水溶液中で1分間振とう後取り出し、真空ポンプで吸引しながら６０分間デシケーター中で乾燥した。該コンジュゲートパッドにA_{520}＝1．0に調整した金コロイド標識α６７１５を２５μｌ添加し、真空ポンプで吸引しながら６０分間デシケーター中で乾燥した。更に、サンプルパッド2（ＭＩＬＬＩＰＯＲＥ社、１７mm×６mm）を0．05％Ｔｗｅｅｎ２０－ＰＢＳ水溶液中で1分間振とう後取り出し、真空ポンプで吸引しながら６０分間デシケーター中で乾燥した。尚、吸収パッド5（ＭＩＬＬＩＰＯＲＥ社、２０mm×６mm）は未処理のまま用いた。

このように調製した、図１に示すような免疫クロマト法ストリップの各構成部分をプラスチックの支持台上に配置し、図２に示すような免疫クロマト法ストリップを組み立てた。

（3）免疫クロマト法ストリップの特異性、感度評価

免疫クロマト法ストリップのサンプルパッド２上に、標準菌体のＰＢＳ懸濁液

１００μｌを添加し、１０分後にスポットの有無を判定した。判定は、固定化抗体スポット上に捕捉された金コロイドの程度を前記表１に示した基準に基づき４段階（＋＋＋：強い陽性、＋＋：陽性、＋：弱い陽性、－：陰性）に目視で識別し、感度及び定量性を評価した。結果を表９に示す。

表９

菌株	菌種／血清型	被検体液菌濃度（個/ml）	判定
B13	ストレプトコッカス・ソブリヌス/d	10^7	+++
B13	ストレプトコッカス・ソブリヌス/d	10^6	++
B13	ストレプトコッカス・ソブリヌス/d	10^5	+
B13	ストレプトコッカス・ソブリヌス/d	10^4	-
6715	ストレプトコッカス・ソブリヌス/g	10^7	+++
6715	ストレプトコッカス・ソブリヌス/g	10^6	++
6715	ストレプトコッカス・ソブリヌス/g	10^5	+
6715	ストレプトコッカス・ソブリヌス/g	10^4	-
Ingbritt	ストレプトコッカス・ミュータンス/c	10^9	-
P4	ストレプトコッカス・ミュータンス/e	10^9	-
OMZ175	ストレプトコッカス・ミュータンス/f	10^9	-
ATCC10556	ストレプトコッカス・サンギス	10^9	-
IFO14252	ストレプトコッカス・サリバリウス	10^9	-
ATCC49456	ストレプトコッカス・ミティス	10^9	-
ATCC35037	ストレプトコッカス・オラリス	10^9	-
Charis	ストレプトコッカス・ゴルドニー	10^9	-

比較例１　ストレプトコッカス・ミュータンスによる吸収処理をしない、ストレプトコッカス・ソブリヌスに対するポリクローナルの評価

先ず、製造例１の（２）で得られたストレプトコッカス・ソブリヌスに対する抗血清を、ストレプトコッカス・ミュータンスの菌体による吸収処理をしないで、製造例１（３）の操作手順に従い、プロテインAカラム処理のみ行い、ＩｇＧ画

分を調製した（以下、「未精製ポリクローナル抗体」と表記することもある）。次いで、製造例１（４）の操作手順に従い、未精製ポリクローナル抗体と菌体との反応性を直接ＥＬＩＳＡ法により評価した。結果を表１０に示す。

表１０

菌株	菌種／血清型	菌数(個/ウェル)	A_{405}
B13	ストレプトコッカス・ソブリヌス/d	10^5	0.657
B13	ストレプトコッカス・ソブリヌス/d	10^6	1.689
B13	ストレプトコッカス・ソブリヌス/d	10^7	>2.000
6715	ストレプトコッカス・ソブリヌス/g	10^5	0.678
6715	ストレプトコッカス・ソブリヌス/g	10^6	1.712
6715	ストレプトコッカス・ソブリヌス/g	10^7	>2.000
Ingbritt	ストレプトコッカス・ミュータンス/c	10^5	0.206
Ingbritt	ストレプトコッカス・ミュータンス/c	10^6	0.521
Ingbritt	ストレプトコッカス・ミュータンス/c	10^7	0.823
P4	ストレプトコッカス・ミュータンス/e	10^5	0.184
P4	ストレプトコッカス・ミュータンス/e	10^6	0.460
P4	ストレプトコッカス・ミュータンス/e	10^7	0.735
OMZ175	ストレプトコッカス・ミュータンス/f	10^5	0.128
OMZ175	ストレプトコッカス・ミュータンス/f	10^6	0.316
OMZ175	ストレプトコッカス・ミュータンス/f	10^7	0.494
ATCC10556	ストレプトコッカス・サンギス	10^7	0.008
IFO14252	ストレプトコッカス・サリバリウス	10^7	0.010
ATCC49456	ストレプトコッカス・ミティス	10^7	0.007
ATCC35037	ストレプトコッカス・オラリス	10^7	0.012
Charis	ストレプトコッカス・ゴルドニー	10^7	0.014

また、実施例１の操作手順に従い金コロイド標識抗体を調製後、免疫クロマト法ストリップを作製し、菌体との反応性を評価した。結果を表１１に示す。

表１１

菌株	菌種／血清型	被検体液菌濃度（個/ml）	判定
B13	ストレプトコッカス・ソブリヌス/d	10^7	+++
B13	ストレプトコッカス・ソブリヌス/d	10^6	++
B13	ストレプトコッカス・ソブリヌス/d	10^5	+
B13	ストレプトコッカス・ソブリヌス/d	10^4	-
6715	ストレプトコッカス・ソブリヌス/g	10^7	+++
6715	ストレプトコッカス・ソブリヌス/g	10^6	++
6715	ストレプトコッカス・ソブリヌス/g	10^5	+
6715	ストレプトコッカス・ソブリヌス/g	10^4	-
Ingbritt	ストレプトコッカス・ミュータンス/c	10^8	+++
Ingbritt	ストレプトコッカス・ミュータンス/c	10^7	++
Ingbritt	ストレプトコッカス・ミュータンス/c	10^6	+
P4	ストレプトコッカス・ミュータンス/e	10^8	++
P4	ストレプトコッカス・ミュータンス/e	10^7	+
P4	ストレプトコッカス・ミュータンス/e	10^6	+
OMZ175	ストレプトコッカス・ミュータンス/f	10^8	++
OMZ175	ストレプトコッカス・ミュータンス/f	10^7	+
OMZ175	ストレプトコッカス・ミュータンス/f	10^6	-
ATCC10556	ストレプトコッカス・サンギス	10^9	-
IFO14252	ストレプトコッカス・サリバリウス	10^9	-
ATCC49456	ストレプトコッカス・ミティス	10^9	-
ATCC35037	ストレプトコッカス・オラリス	10^9	-
Charis	ストレプトコッカス・ゴルドニー	10^9	-

表１０から、未精製ポリクローナル抗体のストレプトコッカス・ソブリヌスに対する反応性は、ストレプトコッカス・ミュータンスに対する反応性の１０倍以下であることが分かる。また、表１１から、未精製ポリクローナル抗体を用いた免疫クロマト法ストリップを用いた場合には、ストレプトコッカス・ミュータン

スに対する反応が検出され、ストレプトコッカス・ソブリヌスを特異的に検出することは出来なかった。

実施例２　免疫クロマト法ストリップによる歯垢からのストレプトコッカス・ソブリヌスの検出

（１）歯垢を含む被検体液の調製

１２０人より、口腔内を水で洗浄し唾液成分を除去後、スパチュラを用いて歯垢を採取した。歯垢を秤量後、１ｍｇ湿重量／ｍｌとなるようＰＢＳに懸濁し、２０秒間、６０Ｗで超音波処理することで歯垢を含む被検体液を得た。

（２）培養法による歯垢試料溶液中のストレプトコッカス・ソブリヌスの定量

上記（１）の方法に従い得られた歯垢を含む被検体液を適宜希釈して、１００μｌをミチス・サリバリウス・バシトラシン（以下、「ＭＳＢ」と表記することもある。）固体培地上およびＢＨＩ固体培地上に添加し、３７℃、嫌気条件下、２４時間培養した。ＭＳＢおよびＢＨＩ固体培地上に生じるコロニー数を計数し、被検体液の希釈率から、ミュータンスレンサ球菌濃度を個／ｍｌとして算出した。ＭＳＢおよびＢＨＩ培地上のストレプトコッカス・ソブリヌス及びストレプトコッカス・ミュータンスの識別は、コロニーの形態学的分類、及び形態学的に識別不可能なコロニーに関しては、該コロニーを純粋培養後、ミュータンスレンサ球菌の血清型特異的な抗体を利用した免疫学的測定方法及び、糖発酵試験等の生化学的方法によりストレプトコッカス・ソブリヌス及びストレプトコッカス・ミュータンスの同定を行った。

（３）免疫クロマト法ストリップによる歯垢を含む被検体液中のストレプトコッカス・ソブリヌスの測定

上記（２）の検討により、ストレプトコッカス・ソブリヌスが検出された８検体、及びストレプトコッカス・ソブリヌスが検出されず、ストレプトコッカス・ミュータンスが検出された５検体、及び両者とも検出されない１検体の被検体液２００μｌについて、実施例２の（２）と同様の方法で作製した免疫クロマト法ストリップを用いストレプトコッカス・ソブリヌスの測定を実施した。免疫クロマト法ストリップに於ける１０分後のスポット発色強度を前記表１に示した基準

に基づき識別し、4段階（＋＋＋：強い陽性、＋＋：陽性、＋：弱い陽性、－：陰性）に識別した結果と、（2）の培養法により得られたストレプトコッカス・ソブリヌス菌数とを比較した。結果を表１２に示す。

表１２

検体	培養法		免疫クロマト法
	ストレプトコッカス・ソブリヌス (×10^5個/ml)	ストレプトコッカス・ミュータンス (×10^5個/ml)	判定
1	138.0	122.0	+++
2	36.8	16.0	++
3	19.2	139.0	++
4	3.38	18.0	+
5	2.24	29.0	+
6	2.09	8.0	+
7	1.84	1.52	+
8	1.6	7.0	+
9	0.00	52.8	-
10	0.00	3.92	-
11	0.00	0.88	-
12	0.00	0.78	-
13	0.00	0.01	-
14	0.00	0.00	-

表１２より、培養法により得られたストレプトコッカス・ソブリヌスの濃度と相関し、ストレプトコッカス・ミュータンスの濃度とは相関しないスポット発色強度が得られた。本発明の免疫クロマト法ストリップにより、ストレプトコッカス・ソブリヌスを１０^{5}個／ｍｌ以上の濃度で含む被検体液から、ストレプトコッカス・ソブリヌスをその濃度依存的に、特異的に検出可能であった。

製造例２　ストレプトコッカス・ミュータンスに対するポリクローナル抗体の

作製、抗体の反応性評価

（１）菌体試料懸濁液の調製

製造例１（１）の方法に従い、Ｉｎｇｂｒｉｔｔ（ストレプトコッカス・ミュータンス、血清型ｃ）の菌体試料懸濁液を調製した。A_{600}＝１．０に調整した該菌体試料懸濁液の菌体濃度を求めたところ、約２×１０^{9}個／ｍｌであった。

同様の操作により、Ｂ１３（ストレプトコッカス・ソブリヌス、血清型ｄ）、６７１５（ストレプトコッカス・ソブリヌス、血清型ｇ）、Ｐ４（ストレプトコッカス・ミュータンス、血清型ｅ）、ＯＭＺ１７５（ストレプトコッカス・ミュータンス、血清型ｆ）、ＡＴＣＣ１０５５６（ストレプトコッカス・サンギス）、ＩＦＯ１４２５２（ストレプトコッカス・サリバリウス）、ＡＴＣＣ４９４５６（ストレプトコッカス・ミティス）、ＡＴＣＣ３５０３７（ストレプトコッカス・オラリス）、Ｃｈａｒｉｓ（ストレプトコッカス・ゴルドニー）の菌体試料懸濁液を調製した。

（２）ストレプトコッカス・ミュータンスに対する抗血清の作製

製造例１（２）の方法に従い、１０ｍｇ湿菌／ｍｌのＩｎｇｂｒｉｔｔの菌体懸濁液を調製した。該菌体懸濁液を、５ｍｇ湿菌／ｍｌとなるよう０．５％ホルマリン－ＰＢＳで倍希釈し菌体抗原懸濁液とし、製造例１（２）の方法に従いウサギに免疫することでストレプトコッカス・ミュータンスに対する抗血清を得た。

（３）ストレプトコッカス・ミュータンスに対するポリクローナル抗体の精製

（１）で調製したＢ１３（ストレプトコッカス・ソブリヌス、血清型ｄ）、６７１５（ストレプトコッカス・ソブリヌス、血清型ｇ）、ＡＴＣＣ１０５５６（ストレプトコッカス・サンギス）、ＩＦＯ１４２５２（ストレプトコッカス・サリバリウス）、ＡＴＣＣ４９４５６（ストレプトコッカス・ミティス）、ＡＴＣＣ３５０３７（ストレプトコッカス・オラリス）、Ｃｈａｒｉｓ（ストレプトコッカス・ゴルドニー）をそれぞれ約２×１０^{12}個／ｍｌ含む菌体懸濁液２０ｍｌと、上記（２）で得られた抗血清０．５ｍｌを混合し４℃、６０分反応した。混合液を４０００ｇ、５分遠心処理後上清を分取し、０．２２μｍフィルターで濾過した。

次いで、製造例１（３）の方法に従いプロテインＡ処理し、０．５ｍｌの抗血清より約5ｍｇのＩｇＧを回収した。

（４）直接ＥＬＩＳＡ法によるストレプトコッカス・ミュータンスに対するポリクローナル抗体の評価

上記（３）で精製したストレプトコッカス・ミュータンスに対するポリクローナル抗体（以下「αＩｎｇｂｒｉｔｔ」と表記することもある）と、各菌体との反応性評価は、以下の直接ＥＬＩＳＡ法により行った。

すなわち、先ず、上記（１）の方法で得られた菌体試料懸濁液を、０．１M炭酸緩衝液（ｐＨ９．０）にて$1\times10^{5}\sim10^{9}$個／ｍｌとなるよう希釈したものを、９６穴イムノプレート（Ｎｕｎｃ社、Ｍａｘｉｓｏｒｐ）の各ウェルに５０μｌずつ添加し、4℃、１２時間放置し固定した。イムノプレートから菌体懸濁液を除去し、３００μｌのＰＢＳで3回洗浄した。

次いで、イムノプレートの各ウェルに、２％ＢＳＡ－０．１M炭酸緩衝液（ｐＨ９．０）を３００μｌ添加し、３７℃、２時間放置した後、イムノプレートから2％ＢＳＡ－炭酸緩衝液（ｐＨ９．０）を除去し、３００μｌの０．０５％ＴｗｅｅｎＴ２０－ＰＢＳ（ｐＨ７．４）で3回洗浄した。

次いで、αＩｎｇｂｒｉｔｔを、1％ＢＳＡ－０．０５％Ｔｗｅｅｎ２０－ＰＢＳ（ｐＨ７．４）にて1．０μｇ／ｍｌとなるよう希釈し、イムノプレートの各ウェルに５０μｌ添加し、３７℃、1時間放置した後、イムノプレートから溶液を除去し、３００μｌの０．０５％Ｔｗｅｅｎ２０－ＰＢＳ（ｐＨ７．４）で３回洗浄した。

次いで、アルカリホスファターゼ標識抗ウサギＩｇＧ（Ｆｃ）ポリクローナル抗体（ヤギ）（カッペル社）を、1％ＢＳＡ－０．０５％Ｔｗｅｅｎ２０－ＰＢＳ（ｐＨ７．４）にて１０μｇ／ｍｌとなるよう希釈し、イムノプレートの各ウェルに５０μｌ添加し、３７℃、1時間放置した後、イムノプレートから溶液を除去し、３００μｌの０．０５％Ｔｗｅｅｎ２０－ＰＢＳ（ｐＨ７．４）で3回洗浄した。

次いで、発色基質溶液として、ｐ－ニトロフェニルリン酸の２－エタノールア

ミン水溶液（ＢＩＯＲＡＤ社）を各ウェルに５０μｌずつ添加し、室温下２０分反応した。反応後、０．４ＭのＮａＯＨを各ウェルに５０μｌずつ添加し反応を停止し、４０５ｎｍの吸光度を測定した。結果を表１３に示す。

表１３

菌株	菌種／血清型	菌数(個/ウェル)	A_{405}
Ingbritt	ストレプトコッカス・ミュータンス/c	5×10^3	0.005
Ingbritt	ストレプトコッカス・ミュータンス/c	5×10^4	0.018
Ingbritt	ストレプトコッカス・ミュータンス/c	5×10^5	0.092
Ingbritt	ストレプトコッカス・ミュータンス/c	5×10^6	0.736
Ingbritt	ストレプトコッカス・ミュータンス/c	5×10^7	1.824
P4	ストレプトコッカス・ミュータンス/e	5×10^3	0.004
P4	ストレプトコッカス・ミュータンス/e	5×10^4	0.016
P4	ストレプトコッカス・ミュータンス/e	5×10^5	0.081
P4	ストレプトコッカス・ミュータンス/e	5×10^6	0.613
P4	ストレプトコッカス・ミュータンス/e	5×10^7	1.475
OMZ175	ストレプトコッカス・ミュータンス/f	5×10^3	0.004
OMZ175	ストレプトコッカス・ミュータンス/f	5×10^4	0.010
OMZ175	ストレプトコッカス・ミュータンス/f	5×10^5	0.065
OMZ175	ストレプトコッカス・ミュータンス/f	5×10^6	0.455
OMZ175	ストレプトコッカス・ミュータンス/f	5×10^7	1.103
B13	ストレプトコッカス・ソブリヌス/d	5×10^5	0.002
B13	ストレプトコッカス・ソブリヌス/d	5×10^6	0.004
B13	ストレプトコッカス・ソブリヌス/d	5×10^7	0.010
6715	ストレプトコッカス・ソブリヌス/g	5×10^5	0.003
6715	ストレプトコッカス・ソブリヌス/g	5×10^6	0.004
6715	ストレプトコッカス・ソブリヌス/g	5×10^7	0.008
ATCC10556	ストレプトコッカス・サンギス	5×10^7	0.004
IFO14252	ストレプトコッカス・サリバリウス	5×10^7	0.003
ATCC49456	ストレプトコッカス・ミティス	5×10^7	0.004
ATCC35037	ストレプトコッカス・オラリス	5×10^7	0.008
Charis	ストレプトコッカス・ゴルドニー	5×10^7	0.010

表１３より、５×１０⁵個／ウェルのストレプトコッカス・ミュータンスを抗原として使用し抗原抗体反応の検出を行った場合に、５×１０⁷個／ウェルの他の口腔内レンサ球菌を抗原として使用した場合よりも高い反応が検出されることから、αＩｎｇｂｒｉｔｔのストレプトコッカス・ミュータンスに対する反応性は、他の口腔内レンサ球菌に対する反応性の１００倍以上であることが分かる。

実施例３　ストレプトコッカス・ソブリヌスとストレプトコッカス・ミュータンスの同時測定用免疫クロマト法ストリップの作製、評価

（１）金コロイド標識されたストレプトコッカス・ミュータンスに対するポリクローナル抗体の調製

実施例１（１）の方法に従い、αＩｎｇｂｒｉｔｔの金コロイド標識物（以下、「金コロイド標識αＩｎｇｂｒｉｔｔ」と表記することもある）を調製し、４℃にて保存した。

（２）免疫クロマト法ストリップの作製

ニトロセルロースメンブレン（ＭＩＬＬＩＰＯＲＥ社、Ｈｉ－Ｆｌｏｗ Ｍｅｍｂｒａｎｅ、２５mm×６mm）からなる展開メンブレン４上の検出ライン６の位置に、それぞれ1ｍｇ／ｍｌのα６７１５、αＩｎｇｂｒｉｔｔ１μｌを、展開方向に対して並列にスポットし、コントロール判定ライン７上に１ｍｇ／ｍｌの抗ウサギＩｇＧ（Ｈ＋Ｌ）ポリクローナル抗体１μｌをスポットし、インキュベーター内で３７℃、６０分乾燥し抗体を固定化した。該抗体固定化メンブレンを1％スキムミルク－０．１％ＴｒｉｔｏｎＸ１００水溶液中で室温下、５分振とうした。次いで、該メンブレンを１０mMリン酸緩衝液（ｐＨ７．４）中で室温下、１０分振とう後取り出し、真空ポンプで吸引しながら６０分間デシケーター中で乾燥した。

また、コンジュゲートパッド３（ＭＩＬＬＩＰＯＲＥ社、７．５mm×６mm）を０．５％ＰＶＡ－０．５％ショ糖水溶液中で1分間振とう後取り出し、真空ポンプで吸引しながら６０分間デシケーター中で乾燥した。該コンジュゲートパッドにA_{520}＝２．０に調整した金コロイド標識α６７１５及びA_{520}＝２．０に調整した金コロイド標識αＩｎｇｂｒｉｔｔをそれぞれ１２．５μｌ添加し、真空

ポンプで吸引しながら６０分間デシケーター中で乾燥した。更に、サンプルパッド2（ＭＩＬＬＩＰＯＲＥ社、１７mm×６mm）を1%Ｔｗｅｅｎ２０−ＰＢＳ水溶液中で１分間振とう後取り出し、真空ポンプで吸引しながら６０分間デシケーター中で乾燥した。尚、吸収パッド5（ＭＩＬＬＩＰＯＲＥ社、２０mm×６mm）は未処理のまま用いた。

このように調製した、図４に示すような免疫クロマト法ストリップの各構成部分をプラスチックの支持台上に配置し、図２に示すような免疫クロマト法ストリップを組み立てた。

（３）免疫クロマト法ストリップの特異性、感度評価

免疫クロマト法ストリップのサンプルパッド２上に、標準菌体のＰＢＳ懸濁液１００μｌを添加し、１０分後にスポットの有無を判定した。判定は、固定化抗体スポット上に捕捉された金コロイドの程度を４段階（＋＋＋：強い陽性、＋＋：陽性、＋：弱い陽性、－：陰性）に目視で識別し、感度及び定量性を評価した。結果を表１４に示す。

表１４

菌株	菌種／血清型	被検体液菌濃度(個/ml)	判定 検出ライン6a (ストレプトコッカス・ソブリヌス検出)	判定 検出ライン6b (ストレプトコッカス・ミュータンス検出)
B13	ストレプトコッカス・ソブリヌス/d	10^9	+++	−
B13	ストレプトコッカス・ソブリヌス/d	10^8	+++	−
B13	ストレプトコッカス・ソブリヌス/d	10^7	+++	−
B13	ストレプトコッカス・ソブリヌス/d	10^6	++	−
B13	ストレプトコッカス・ソブリヌス/d	10^5	+	−
B13	ストレプトコッカス・ソブリヌス/d	10^4	−	−
6715	ストレプトコッカス・ソブリヌス/g	10^9	+++	−
6715	ストレプトコッカス・ソブリヌス/g	10^8	+++	−
6715	ストレプトコッカス・ソブリヌス/g	10^7	+++	−
6715	ストレプトコッカス・ソブリヌス/g	10^6	++	−
6715	ストレプトコッカス・ソブリヌス/g	10^5	+	−
6715	ストレプトコッカス・ソブリヌス/g	10^4	−	−
Ingbritt	ストレプトコッカス・ミュータンス/c	10^9	−	+++
Ingbritt	ストレプトコッカス・ミュータンス/c	10^8	−	++
Ingbritt	ストレプトコッカス・ミュータンス/c	10^7	−	+
Ingbritt	ストレプトコッカス・ミュータンス/c	10^6	−	+
Ingbritt	ストレプトコッカス・ミュータンス/c	10^5	−	−
P4	ストレプトコッカス・ミュータンス/e	10^9	−	+++
P4	ストレプトコッカス・ミュータンス/e	10^8	−	++
P4	ストレプトコッカス・ミュータンス/e	10^7	−	+
P4	ストレプトコッカス・ミュータンス/e	10^6	−	+
P4	ストレプトコッカス・ミュータンス/e	10^5	−	−
OMZ175	ストレプトコッカス・ミュータンス/f	10^9	−	+++
OMZ175	ストレプトコッカス・ミュータンス/f	10^8	−	++
OMZ175	ストレプトコッカス・ミュータンス/f	10^7	−	+
OMZ175	ストレプトコッカス・ミュータンス/f	10^6	−	−
OMZ175	ストレプトコッカス・ミュータンス/f	10^5	−	−
ATCC10556	ストレプトコッカス・サンギス	10^9	−	−
IFO14252	ストレプトコッカス・サリバリウス	10^9	−	−
ATCC49456	ストレプトコッカス・ミティス	10^9	−	−
ATCC35037	ストレプトコッカス・オラリス	10^9	−	−
Charis	ストレプトコッカス・ゴルドニー	10^9	−	−

表１４より、被検体液中のストレプトコッカス・ソブリヌス及びストレプトコッカス・ミュータンスの検出を行った際に、検出ライン６の位置のストレプトコッカス・ソブリヌス検出用スポットでは、1×10^{5}個／ｍｌから1×10^{9}個／ｍｌの範囲において被検体液中のストレプトコッカス・ソブリヌスが特異的に検出されることが分かる。また、ストレプトコッカス・ミュータンス検出用スポットでは、Ｉｎｇｂｒｉｔｔ（血清型ｃ）及びＰ４（血清型ｅ）を分析した場合に1×10^{6}個／ｍｌから1×10^{9}個／ｍｌの範囲において、またＯＭＺ１７５（血清型ｆ）を分析した場合に1×10^{7}個／ｍｌから1×10^{9}個／ｍｌの範囲において被検体液中のストレプトコッカス・ミュータンスが特異的に検出されることが分かる。ストレプトコッカス・ミュータンスの検出感度をストレプトコッカス・ソブリヌスの検出感度と同様に10^{5}個／ｍｌとするためには、より反応性の高い抗体をとれば良い。そのような抗体の反応性としては、製造例２の（４）の直接ＥＬＩＳＡ法において、5×10^{3}個／ウェルのストレプトコッカス・ミュータンスを分析した場合に、バックグラウンド以上の反応が検出される程度の反応性を有する抗体が必要である。

実施例４　<u>免疫クロマト法ストリップによる歯垢を含む被検体液中のストレプトコッカス・ソブリヌス量及びストレプトコッカス・ミュータンス量の同時測定</u>

実施例２と同じ１４検体の被検体液２００μｌについて、実施例３の（２）と同様の方法で作製した免疫クロマト法ストリップを用いストレプトコッカス・ソブリヌス量及びストレプトコッカス・ミュータンス量の同時測定を実施した。免疫クロマト法ストリップに於ける１０分後のスポット発色強度を４段階（＋＋＋：強い陽性、＋＋：陽性、＋：弱い陽性、－：陰性）に識別した結果と、培養法により得られたストレプトコッカス・ソブリヌス及びストレプトコッカス・ミュータンス菌数とを比較した。結果を表１５に示す。

表１５

検体	培養法		免疫クロマト法	
	ｽﾄﾚﾌﾟﾄｺｯｶｽ・ｿﾌﾞﾘﾇｽ (×10⁵個/ml)	ｽﾄﾚﾌﾟﾄｺｯｶｽ・ﾐｭｰﾀﾝｽ (×10⁵個/ml)	判定(検出ﾗｲﾝ6a) ｽﾄﾚﾌﾟﾄｺｯｶｽ・ｿﾌﾞﾘﾇｽ検出	判定(検出ﾗｲﾝ6b) ｽﾄﾚﾌﾟﾄｺｯｶｽ・ﾐｭｰﾀﾝｽ検出
1	138.0	122.0	+++	++
2	36.8	16.0	++	+
3	19.2	139.0	++	++
4	3.38	18.0	+	+
5	2.24	29.0	+	+
6	2.09	8.0	+	+
7	1.84	1.52	+	−
8	1.6	7.0	+	+
9	0.00	52.8	−	++
10	0.00	3.92	−	−
11	0.00	0.88	−	−
12	0.00	0.78	−	−
13	0.00	0.01	−	−
14	0.00	0.00	−	−

表１５より、ストレプトコッカス・ソブリヌス検出用スポットでは、培養法により得られたストレプトコッカス・ミュータンスの濃度に関わらずストレプトコッカス・ソブリヌスの濃度と相関したスポット発色強度が得られた。また、ストレプトコッカス・ミュータンス検出用スポットでは、培養法により得られたストレプトコッカス・ソブリヌスの濃度に関わらず、７×１０⁵個／ｍｌ以上のストレプトコッカス・ミュータンスが検出された。本発明の同時測定用免疫クロマト法ストリップにより、ストレプトコッカス・ソブリヌス及びストレプトコッカス・ミュータンスを１０⁵個／ｍｌ以上の濃度で含む被検体液から、１０⁵個／ｍｌ以上のストレプトコッカス・ソブリヌスをその濃度依存的に且つ特異的に、７×１０⁵個／ｍｌ以上のストレプトコッカス・ミュータンスを特異的に同時検出可能

であった。

製造例３　ストレプトコッカス・ミュータンス及びストレプトコッカス・ソブリヌスに反応するポリクローナル抗体の作製、抗体の反応性評価

製造例２で作製した１０ｍｇのαＩｎｇｂｒｉｔｔと製造例１で作製した１ｍｇのα６７１５とを混合し、ストレプトコッカス・ミュータンス及びストレプトコッカス・ソブリヌスに反応するポリクローナル抗体（以下「αＩｎｇｂｒｉｔｔ－６７１５」と表記することもある）を作製した。αＩｎｇｂｒｉｔｔ－６７１５と各菌体との反応性評価を、製造例２（４）の方法に従い直接ＥＬＩＳＡ法により行った。結果を表１６に示す。

表１６

菌株	菌種／血清型	菌数(個/ウェル)	A_{405}
Ingbritt	ストレプトコッカス・ミュータンス/c	5×10^3	0.005
Ingbritt	ストレプトコッカス・ミュータンス/c	5×10^4	0.013
Ingbritt	ストレプトコッカス・ミュータンス/c	5×10^5	0.070
Ingbritt	ストレプトコッカス・ミュータンス/c	5×10^6	0.680
Ingbritt	ストレプトコッカス・ミュータンス/c	5×10^7	1.535
P4	ストレプトコッカス・ミュータンス/e	5×10^3	0.005
P4	ストレプトコッカス・ミュータンス/e	5×10^4	0.012
P4	ストレプトコッカス・ミュータンス/e	5×10^5	0.065
P4	ストレプトコッカス・ミュータンス/e	5×10^6	0.624
P4	ストレプトコッカス・ミュータンス/e	5×10^7	1.324
OMZ175	ストレプトコッカス・ミュータンス/f	5×10^3	0.004
OMZ175	ストレプトコッカス・ミュータンス/f	5×10^4	0.010
OMZ175	ストレプトコッカス・ミュータンス/f	5×10^5	0.048
OMZ175	ストレプトコッカス・ミュータンス/f	5×10^6	0.478
OMZ175	ストレプトコッカス・ミュータンス/f	5×10^7	1.085
B13	ストレプトコッカス・ソブリヌス/d	5×10^3	0.005
B13	ストレプトコッカス・ソブリヌス/d	5×10^4	0.014
B13	ストレプトコッカス・ソブリヌス/d	5×10^5	0.068
B13	ストレプトコッカス・ソブリヌス/d	5×10^6	0.625
B13	ストレプトコッカス・ソブリヌス/d	5×10^7	1.398
6715	ストレプトコッカス・ソブリヌス/g	5×10^3	0.005
6715	ストレプトコッカス・ソブリヌス/g	5×10^4	0.013
6715	ストレプトコッカス・ソブリヌス/g	5×10^5	0.071
6715	ストレプトコッカス・ソブリヌス/g	5×10^6	0.641
6715	ストレプトコッカス・ソブリヌス/g	5×10^7	1.435
ATCC10556	ストレプトコッカス・サンギス	5×10^7	0.004
IFO14252	ストレプトコッカス・サリバリウス	5×10^7	0.003
ATCC49456	ストレプトコッカス・ミティス	5×10^7	0.004
ATCC35037	ストレプトコッカス・オラリス	5×10^7	0.006
Charis	ストレプトコッカス・ゴルドニー	5×10^7	0.007

表１６より、５×１０^{5}個／ウェルのストレプトコッカス・ミュータンス或いはストレプトコッカス・ソブリヌスを抗原として使用し抗原抗体反応の検出を行った場合に、５×１０^{7}個／ウェルの他の口腔内レンサ球菌を抗原として使用した場合よりも高い反応が検出されることから、αＩｎｇｂｒｉｔｔ－６７１５のストレプトコッカス・ミュータンス或いはストレプトコッカス・ソブリヌスに対する反応性は、他の口腔内レンサ球菌に対する反応性の１００倍以上であることが分かる。また、５×１０^{5}個／ウェルから５×１０^{7}個／ウェルの範囲において、同一菌体量のストレプトコッカス・ミュータンスとストレプトコッカス・ソブリヌスを抗原とし、抗原抗体反応の検出を行った際に、ストレプトコッカス・ミュータンスとストレプトコッカス・ソブリヌスより検出される反応が１．５倍以内であることから、αＩｎｇｂｒｉｔｔ－６７１５のストレプトコッカス・ミュータンスとストレプトコッカス・ソブリヌスに対する反応性が同等であることが分かる。

実施例５　<u>ストレプトコッカス・ソブリヌス量とストレプトコッカス・ミュータンス及びストレプトコッカス・ソブリヌス総量の同時測定用免疫クロマト法ストリップの作製、評価</u>

（１）<u>金コロイド標識されたストレプトコッカス・ミュータンス及びストレプトコッカス・ソブリヌスに反応するポリクローナル抗体の調製</u>

実施例１（１）の方法に従い、αＩｎｇｂｒｉｔｔ－６７１５の金コロイド標識物（以下、「金コロイド標識αＩｎｇｂｒｉｔｔ－６７１５」と表記することもある）を調製し、４℃にて保存した。

（２）<u>免疫クロマト法ストリップの作製</u>

ニトロセルロースメンブレン（ＭＩＬＬＩＰＯＲＥ社、Ｈｉ－Ｆｌｏｗ Ｍｅｍｂｒａｎｅ、２５mm×６mm）からなる展開メンブレン４上の検出ライン６の位置に、それぞれ１ｍｇ／ｍｌのα６７１５、αＩｎｇｂｒｉｔｔ－６７１５ １μｌを、展開方向に対して並列にスポットし、コントロール判定ライン７上に１ｍｇ／ｍｌの抗ウサギＩｇＧ（Ｈ＋Ｌ）ポリクローナル抗体１μｌをスポットした。また、コンジュゲートパッド３にA_{520}＝２．０に調整した金コロイド標

識α６７１５及びA_{520}＝２．０に調整した金コロイド標識αＩｎｇｂｒｉｔｔ－６７１５をそれぞれ１２．５μｌ添加した。上記以外の操作は実施例１（２）の方法に従い、図４に示すような免疫クロマト法ストリップの各構成部分を調製し、該各構成部分をプラスチックの支持台上に配置し、図２に示すような免疫クロマト法ストリップを組み立てた。

（３）免疫クロマト法ストリップの特異性、感度評価

免疫クロマト法ストリップのサンプルパッド２上に、標準菌体のＰＢＳ懸濁液１００μｌを添加し、１０分後にスポットの有無を判定した。判定は、固定化抗体スポット上に捕捉された金コロイドの程度を４段階（＋＋＋：強い陽性、＋＋：陽性、＋：弱い陽性、－：陰性）に目視で識別し、感度及び定量性を評価した。結果を表１７に示す。

表１７

菌株	菌種／血清型	被検体液菌濃度（個/ml）	判定 検出ライン6a（ストレプトコッカス・ソブリヌス検出）	判定 検出ライン6b（ミュータンス及びソブリヌス総量検出）
B13	ストレプトコッカス・ソブリヌス/d	10^9	+++	+++
B13	ストレプトコッカス・ソブリヌス/d	10^8	+++	++
B13	ストレプトコッカス・ソブリヌス/d	10^7	+++	+
B13	ストレプトコッカス・ソブリヌス/d	10^6	++	+
B13	ストレプトコッカス・ソブリヌス/d	10^5	+	−
B13	ストレプトコッカス・ソブリヌス/d	10^4	−	−
6715	ストレプトコッカス・ソブリヌス/g	10^9	+++	+++
6715	ストレプトコッカス・ソブリヌス/g	10^8	+++	++
6715	ストレプトコッカス・ソブリヌス/g	10^7	+++	+
6715	ストレプトコッカス・ソブリヌス/g	10^6	++	+
6715	ストレプトコッカス・ソブリヌス/g	10^5	+	−
6715	ストレプトコッカス・ソブリヌス/g	10^4	−	−
Ingbritt	ストレプトコッカス・ミュータンス/c	10^9	−	+++
Ingbritt	ストレプトコッカス・ミュータンス/c	10^8	−	++
Ingbritt	ストレプトコッカス・ミュータンス/c	10^7	−	+
Ingbritt	ストレプトコッカス・ミュータンス/c	10^6	−	+
Ingbritt	ストレプトコッカス・ミュータンス/c	10^5	−	−
P4	ストレプトコッカス・ミュータンス/e	10^9	−	+++
P4	ストレプトコッカス・ミュータンス/e	10^8	−	++
P4	ストレプトコッカス・ミュータンス/e	10^7	−	+
P4	ストレプトコッカス・ミュータンス/e	10^6	−	+
P4	ストレプトコッカス・ミュータンス/e	10^5	−	−
OMZ175	ストレプトコッカス・ミュータンス/f	10^9	−	+++
OMZ175	ストレプトコッカス・ミュータンス/f	10^8	−	++
OMZ175	ストレプトコッカス・ミュータンス/f	10^7	−	+
OMZ175	ストレプトコッカス・ミュータンス/f	10^6	−	−
OMZ175	ストレプトコッカス・ミュータンス/f	10^5	−	−
ATCC10556	ストレプトコッカス・サンギス	10^9	−	−
IFO14252	ストレプトコッカス・サリバリウス	10^9	−	−
ATCC49456	ストレプトコッカス・ミティス	10^9	−	−
ATCC35037	ストレプトコッカス・オラリス	10^9	−	−
Charis	ストレプトコッカス・ゴルドニー	10^9	−	−

表１７より、被検体液中のストレプトコッカス・ソブリヌス及びストレプトコッカス・ミュータンスとストレプトコッカス・ソブリヌスの総量の検出を行った際に、検出ライン６の位置のストレプトコッカス・ソブリヌス検出用スポットでは、1×10^5個／ｍｌから1×10^9個／ｍｌの範囲において被検体液中のストレプトコッカス・ソブリヌスが特異的に検出されることが分かる。また、ストレプトコッカス・ミュータンスとストレプトコッカス・ソブリヌスの総量検出用スポットでは、1×10^7個／ｍｌ或いは1×10^6個／ｍｌから1×10^9個／ｍｌのストレプトコッカス・ミュータンス或いはストレプトコッカス・ソブリヌスを含む被検体液において陽性反応が得られており、1×10^9個／ｍｌの他の口腔内レンサ球菌を含む被検体液が陰性であることから、被検体液中のストレプトコッカス・ミュータンス及びストレプトコッカス・ソブリヌスが特異的に検出されることが分かる。

実施例６　<u>免疫クロマト法ストリップによる歯垢を含む被検体液中のストレプトコッカス・ソブリヌス量及びストレプトコッカス・ミュータンスとストレプトコッカス・ソブリヌス総量の同時測定</u>

実施例２と同じ１４検体の被検体液２００μｌについて、実施例５の（2）と同様の方法で作製した免疫クロマト法ストリップを用いストレプトコッカス・ソブリヌス量及びストレプトコッカス・ミュータンスとストレプトコッカス・ソブリヌス総量の同時測定を実施した。免疫クロマト法ストリップに於ける１０分後のスポット発色強度を４段階（＋＋＋：強い陽性、＋＋：陽性、＋：弱い陽性、－：陰性）に識別した結果と、培養法により得られたストレプトコッカス・ソブリヌス及びストレプトコッカス・ミュータンス菌数とを比較した。結果を表１８に示す。

表１８

検体	培養法			免疫クロマト法	
	ストレプトコッカス・ソブリヌス (×10⁵個/ml)	ストレプトコッカス・ミュータンス (×10⁵個/ml)	ミュータンスとソブリヌス総量 (×10⁵個/ml)	判定 検出ライン6a (ストレプトコッカス・ソブリヌス検出)	判定 検出ライン6b (ミュータンス/ソブリヌス総量検出)
1	138.0	122.0	260.0	+++	+++
2	36.8	16.0	52.8	++	+
3	19.2	139.0	158.2	++	++
4	3.38	18.0	21.38	+	+
5	2.24	29.0	31.24	+	+
6	2.09	8.0	10.09	+	+
7	1.84	1.52	3.36	+	−
8	1.6	7.0	8.6	+	−
9	0.00	52.8	52.8	−	+
10	0.00	3.92	3.92	−	−
11	0.00	0.88	0.88	−	−
12	0.00	0.78	0.78	−	−
13	0.00	0.01	0.01	−	−
14	0.00	0.00	0.00	−	−

表１８より、ストレプトコッカス・ソブリヌス検出用スポットでは、培養法により得られたストレプトコッカス・ミュータンスの濃度に関わらずストレプトコッカス・ソブリヌスの濃度と相関したスポット発色強度が得られた。また、ストレプトコッカス・ミュータンスとストレプトコッカス・ソブリヌス総量の検出用スポットでは、該総量が１０^6個／ｍｌ以上の場合に、特異的な反応が検出された。本発明の同時測定用免疫クロマト法ストリップにより、ストレプトコッカス・ソブリヌス量及びストレプトコッカス・ミュータンスとストレプトコッカス・ソブリヌスの総量を１０^5個／ｍｌ以上の濃度で含む被検体液から、１０^5個／ｍｌ以上のストレプトコッカス・ソブリヌスをその濃度依存的に且つ特異的に、ストレ

プトコッカス・ミュータンスとストレプトコッカス・ソブリヌスの総量が10^6個／ｍｌ以上の場合に特異的な反応を同時検出可能であった。

産業上の利用可能性

本発明によれば、ストレプトコッカス・ミュータンスが混在する唾液又は歯垢を含む被検体液から培養法等を介さずに直接高感度でストレプトコッカス・ソブリヌスを測定することが出来る。特に免疫クロマト法、ラテックス凝集法、フロースルー免疫測定法を用いた本発明の測定方法によれば、歯科医院や家庭で迅速、且つ簡便にストレプトコッカス・ソブリヌスの測定を行うことが可能となる。また、ラテックス定量法、ＥＬＩＳＡ法を用いることで、迅速に多くの被検体液からストレプトコッカス・ソブリヌスを測定することも可能となる。更に本発明によれば、被検体液中のストレプトコッカス・ソブリヌス量及びストレプトコッカス・ミュータンス量（或いはストレプトコッカス・ミュータンスとストレプトコッカス・ソブリヌスの総量）を同時に測定することが出来きる。このように、本発明により、新たな齲蝕危険度の診断システムを構築することも可能となる。

従って、本発明は、診断医療分野、並びに該医療分野で用いる試薬及びデバイスの製造業等において利用可能である。

請 求 の 範 囲

1．ストレプトコッカス・ソブリヌス及びストレプトコッカス・ミュータンスを含むことが疑われる被検体液中のストレプトコッカス・ソブリヌスの検出方法であって、

（A） ストレプトコッカス・ソブリヌスに対する結合能がストレプトコッカス・ミュータンスに対する結合能の１００倍以上である抗体を用意すること、

（B） 該抗体を被検体液と接触させて免疫複合体を形成すること、並びに

（C） 該免疫複合体を測定すること、

を含んでなる方法。

2．ストレプトコッカス・ソブリヌスに対する結合能がストレプトコッカス・ミュータンスに対する結合能の１００倍以上である抗体がポリクローナル抗体である請求項１記載の方法。

3．ストレプトコッカス・ソブリヌスに対する結合能が、該細菌種の血清型ｄ及びｇ株に対するものであり、かつ血清型ｄ及びｇ株に対する結合能が相互に２倍以内である請求項２記載の方法。

4．ストレプトコッカス・ソブリヌス及びストレプトコッカス・ミュータンスを含むことが疑われる被検体液が、１０^{5}～１０^{7}個／ｍｌの濃度でストレプトコッカス・ソブリヌスを含んでなる請求項１記載の方法。

5．免疫複合体の測定が免疫クロマト法により実施される請求項１～４のいずれか一つに記載の方法。

6．被験者における齲蝕の危険度の診断方法であって、

（ａ） 被験者からの唾液及び／又は歯垢に由来する被検体液を調製すること、

（ｂ） ストレプトコッカス・ソブリヌスに対する結合能がストレプトコッカス・ミュータンスに対する結合能の１００倍以上である抗体を用意すること、

（ｃ） 段階（ａ）で調製した被検体液と段階（ｂ）で用意した抗体とを接触させて免疫複合体を形成すること、並びに

（ｄ） 該免疫複合体を測定し、その多寡を齲蝕の危険度の存否の指標として

評価すること、
を含んでなる診断方法。

７．ストレプトコッカス・ソブリヌスに対する結合能がストレプトコッカス・ミュータンスに対する結合能の１００倍以上である抗体がポリクローナル抗体である請求項６記載の診断方法。

８．ストレプトコッカス・ソブリヌスに対する結合能が、該細菌種の血清型ｄ及びｇ株に対するものであり、かつ血清型ｄ及びｇ株に対する結合能が相互に２倍以内である請求項７記載の診断方法。

９．被検体液が、10^5～10^7個／ｍｌの濃度でストレプトコッカス・ソブリヌスを含んでなる請求項６記載の診断方法。

１０．段階（ｃ）を該抗体（Ｓ抗体）の他にストレプトコッカス・ミュータンスに対して特異的に結合する抗体（Ｍ抗体）の共存下に実施するか、或いは段階（ｃ）に加え、Ｓ抗体をＭ抗体に代えて実施すること以外は段階（ｃ）と同様の操作を実施し、こうして形成されるＭ抗体に由来する免疫複合体も測定し、該複合体の多寡も齲蝕の危険度の存否の指標として評価する請求項６～９のいずれか一つに記載の診断方法。

１１．Ｍ抗体に代えてストレプトコッカス・ミュータンス及びストレプトコッカス・ソブリヌスに対して特異的に結合する抗体（ＭＳ抗体）を使用する請求項１０記載の診断方法。

１２．１種又は２種以上の免疫複合体の測定が免疫クロマト法により実施される請求項６～１１のいずれか一つに記載の診断方法。

１３．被検体液が未処理の唾液である請求項６～１２のいずれか一つに記載の診断方法。

１４．ストレプトコッカス・ソブリヌスに対する結合能がストレプトコッカス・ミュータンスに対する結合能の１００倍以上である抗体、さらに必要により、ストレプトコッカス・ミュータンスに対して特異的に結合する抗体、又はストレプトコッカス・ミュータンス及びストレプトコッカス・ソブリヌスに対して特異的に結合する抗体を含んでなる免疫学的測定用キット又は被験者における齲蝕の危

険度の診断用キット。

１５．被検体液を一時的に吸収しそして保持するためのサンプルパッド、標識抗体を一時的に保持するためのコンジュゲートパッド、並びに検出用抗体が固定化され、前記サンプルパッドに一時的に吸収しそして保持された被検体液および該被検体液に随伴して前記コンジュゲートパッドより流出した標識抗体が展開される展開メンブレンがこの順番で接合された免疫クロマトストリップにおいて、前記検出用抗体としてストレプトコッカス・ソブリヌスに対する結合能がストレプトコッカス・ミュータンスに対する結合能の１００倍以上である抗体を用いることを特徴とする免疫クロマトストリップ。

１６．展開メンブレンに固定化される検出用抗体として、ストレプトコッカス・ミュータンスに対して特異的に結合する抗体、又はストレプトコッカス・ミュータンス及びストレプトコッカス・ソブリヌスに対して特異的に結合する抗体を併用することを特徴とする請求項１５に記載の免疫クロマトスリップ。

１７．ストレプトコッカス・ソブリヌスに対する結合能がストレプトコッカス・ミュータンスに対する結合能の１００倍以上でるポリクローナル抗体。

１８．ストレプトコッカス・ソブリヌスに対する結合能が該細菌種の血清型ｄ及びｇ株に対するものであり、かつ血清型ｄ及びｇ株に対する結合能が相互に２倍以内である請求項１７記載のポリクローナル抗体。

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Fig. 1

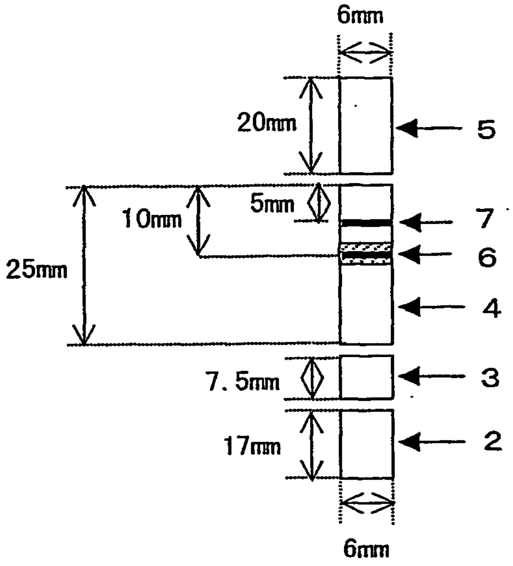
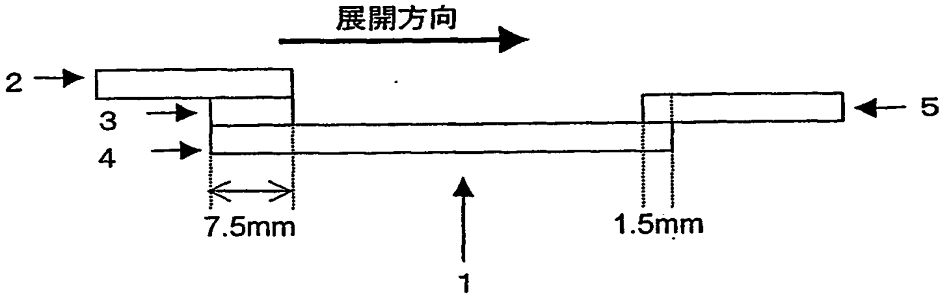

6mm
20mm
5
5mm
10mm
7
25mm
6
4
7. 5mm
3
17mm
2
6mm

Fig. 2


展開方向
2
3
4
5
7.5mm
1.5mm
1

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Fig. 3

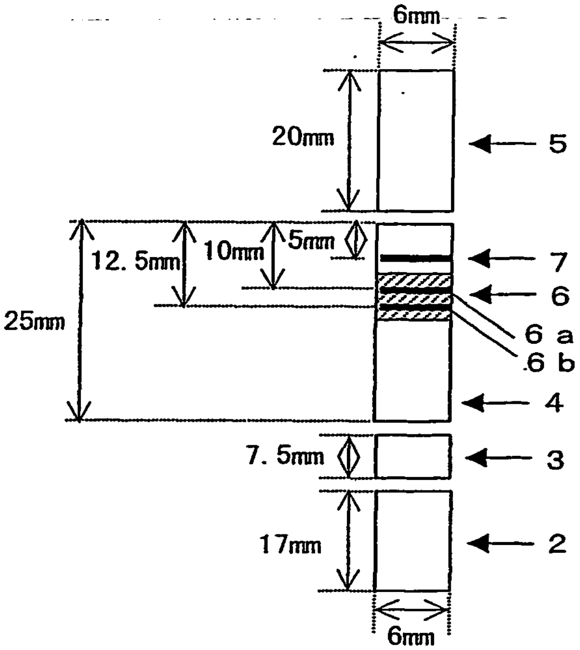
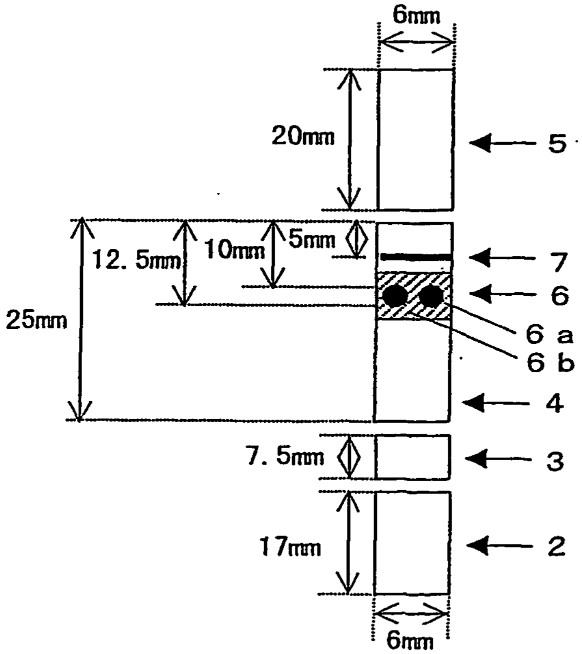

6mm
20mm
5
12. 5mm
10mm
5mm
7
6
25mm
6 a
6 b
4
7. 5mm
3
17mm
2
6mm

Fig. 4


6mm
20mm
5
12. 5mm
10mm
5mm
7
6
25mm
6 a
6 b
4
7. 5mm
3
17mm
2
6mm

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP01/03502

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl^7 G01N33/569

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl^7 G01N33/569

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2001
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2001	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2001

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

JICST, BIOSIS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 1-250067 A (Lion Corp), 05 October, 1989 (05.10.89), (Family: none)	1-5,14-18
A	Katsuhiko HIROTA, "Monoclone Koutai wo Riyou shita Kouso Meneki Sokuteihou ni yoru Mutans Rensa Kyuukin no Jinsoku Kanben Sokuteihou", Shikoku Shishi, Vol.5, No.2, pp. 65-74	1-5,14-18
A	Tsutomu TAKEI, "Latex Gyoushu Hannou wo mochiita Mutans Rensa Kyuukin no Tokuiteki Kenshutsu to Ushoku Katsudousei Shiken e no Ouyou", Handai Igaku Zasshi, 35 (1), pp.93-109, 1990	1-5,14-18

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search 17 July, 2001 (17.07.01)	Date of mailing of the international search report 31 July, 2001 (31.07.01)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP01/03502

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 6-13
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Claims 6 to 13 pertain to diagnostic methods practiced on the human body and thus relate to a subject matter which this International Searching Authority is not required, under the provisions of Article 17(2)(a)(i) of the PCT and Rule 39 of the Regulations under the PCT, to search.

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

国際調査報告　　　　　　国際出願番号　PCT／JP01／03502

A.　発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC））
Int Cl⁷　G01N33／569

B.　調査を行った分野
調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC）） Int Cl⁷　G01N33／569
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの 日本国実用新案公報　　1922－1996年 日本国公開実用新案公報　1971－2001年 日本国登録実用新案公報　1994－2001年 日本国実用新案登録公報　1996－2001年
国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語） JICST, BIOSIS

C.　関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー＊	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求の範囲の番号
A	JP　1－250067　A（ライオン株式会社）5. 10月. 1989（05. 10. 89） （ファミリーなし）	1－5, 14－18
A	弘田克彦「モノクロン抗体を利用した酵素免疫測定法によるミュータンスレンサ球菌の迅速簡便測定法」，四国歯誌，第5巻，第2号，P65－74，（1992）	1－5, 14－18

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。　　☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

＊　引用文献のカテゴリー
「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献
「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日 17. 07. 01	国際調査報告の発送日　31.07.01
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁（ISA／JP） 郵便番号100－8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官（権限のある職員）　2J　9507 竹中靖典 電話番号　03－3581－1101　内線　3252

Ｃ（続き）．　関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー＊	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Ａ	武井　勉「ラテックス凝集反応を用いたミュータンスレンサ球菌の特異的検出と齲蝕活動性試験への応用」阪大医学雑誌，３５（１），P93-109、１９９０	１－５， １４－１８

第Ｉ欄　請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第１ページの２の続き）

法第８条第３項（ＰＣＴ１７条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☒ 請求の範囲　６－１３　は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、

   請求の範囲６－１３は人の身体の診断方法を含むものであり、ＰＣＴ１７条(2)(a)(i)及びＰＣＴ規則３９の規定により、この国際調査機関が調査することを要しない対象に係るものである。

2. ☐ 請求の範囲 ＿＿＿＿＿＿ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、

3. ☐ 請求の範囲 ＿＿＿＿＿＿ は、従属請求の範囲であってＰＣＴ規則6.4(a)の第２文及び第３文の規定に従って記載されていない。

第II欄　発明の単一性が欠如しているときの意見（第１ページの３の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。

2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。

3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。

4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。

☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

THIS PAGE BLANK (USPTO)